

Reaktionen von Zellen des Immunsystems auf Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen und Röntgenstrahlung

Vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. Nat.)
genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. Sandro Conrad

aus Dietzenbach

Referentin:	Prof. Dr. K. Nixdorff
Korreferent:	Prof. Dr. G. Kraft
Tag der Einreichung:	12. November 2007
Tag der mündlichen Prüfung:	09. Januar 2008

Darmstadt 2007

Die vorliegende Dissertation wurde im Rahmen des BMBF-geförderten Projekts
„Genetische Wirkung dicht ionisierender Strahlung“ (Förderkennzeichen: 02 S 8203)
Durchgeführt. Die Ergebnisse aus dieser Dissertation werden für eine Veröffentlichung
vorbereitet.

Conrad, S.; Ritter, S.; Nixdorff, K.: Effects of Radiation with carbon ions on Macrophages

Nasonova, E.; Conrad, S.; Ritter, S.: Chromosomal aberrations in human B-lymphocytes after
Carbon-ion irradiation

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. K. Nixdorff, die es mir ermöglichte, an diesem interessanten und sehr vielfältigen Thema zu forschen. Ihre freundliche Betreuung und ihre Diskussionsbereitschaft trugen im wesentlichen Maße zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn Prof. Dr. G. Kraft danke ich für die Übernahme der Koreferats und die Unterstützung während der Promotion.

Mein Dank gilt weiterhin der „ehemaligen“ Arbeitsgruppe Nixdorff, insbesondere Sybille Ohlweiler und Dagmar Schilling für ihre ständige Hilfsbereitschaft, die angenehme Arbeitsatmosphäre und interessanten Diskussionen.

Frau Dr. Sylvia Ritter und Frau Dr. Claudia Fournier danke ich für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe „Chromosomenaberrationen“ der Abteilung für Biophysik bei der Gesellschaft für Schwerionenforschung in Darmstadt. Vor allem Frau Dr. Ritter danke ich für die nette Betreuung und Hilfe während der Promotion.

Weiterhin danke ich Frau Petra Hessel, die mich bei meinen Versuchen tatkräftig unterstützte, sowie allen Angehörigen der Abteilung Biophysik.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich während der gesamten Promotion unterstützten und an mich glaubten.

1. Zusammenfassung / Abstract.....	5
2. Einleitung.....	7
2.1 Immunsystem.....	7
2.1.1 Strahlenwirkung auf das Immunsystem.....	7
2.1.2 Zellen des Immunsystems.....	8
2.2 Proinflammatorische Zytokine und Stickstoffmonoxid (NO)	12
2.2.1 Interleukin-1 β (IL-1 β).....	13
2.2.2 Tumornekrosefaktor- α (TNF- α).....	13
2.2.3 Stickstoffmonoxid (NO)	14
2.2.4 Biologische Wirkung der inflammatorischen Zytokine.....	14
2.3 Strahlenbiologische Grundlagen.....	15
2.4 Dosis, Fluenz und RBW	17
2.5 Biologische Strahlenschäden	20
2.6 Tiefendosisprofil ionisierender Strahlung.....	21
2.7 Tumorthherapie mit schweren Ionen bei der GSI.....	23
2.8 Zielsetzung der Arbeit.....	25
3. Material und Methoden.....	27
3.1 Verwendete Zellen.....	27
3.1.1 Periphere Blutlymphozyten	27
3.1.2 Periphere Monozyten	27
3.1.3 Murine Makrophagen Zelllinie RAW 264.7.....	28
3.1.4 Humane Vorhautfibroblasten AG1522D	28
3.2 Isolierung peripherer Blutlymphozyten und Monozyten.....	28
3.2.1 Isolierung peripherer Lymphozyten aus Buffy-Coats.....	28
3.2.2 Isolierung peripherer Lymphozyten aus Frischblut	29
3.2.3 Isolierung peripherer Monozyten.....	29
3.3 Zellzahlbestimmung.....	30
3.3.1 Trypanblau-Exklusionsmethode	30
3.3.2 Zellanalysesystem Casy 1	30
3.3.3 Pappenheim-Färbung von Blutzellen.....	30
3.4 Zellkultivierung.....	31
3.4.1 Zellkulturmedien und Zusätze	31
3.4.2 Kultivierung humaner Lymphozyten.....	31
3.4.3 Kultivierung und Stimulierung humaner Monozyten.....	31
3.4.4 Kultivierung und Stimulierung muriner RAW 264.7 Makrophagen.....	32
3.5 Trennung von B-Lymphozyten und T-Lymphozyten.....	32
3.6 Isolierung von B-Lymphozyten mit magnetischen Beads.....	34
3.7 Durchflußzytometrische Charakterisierung von Lymphozyten.....	34
3.8 Bestrahlung der Zellen.....	35
3.8.1 Hochenergetischen Kohlenstoffionen.....	35
3.8.2 Niederenergetische Kohlenstoffionen.....	35
3.8.3 250 kV Röntgenstrahlen	36
3.9 Herstellung von Chromosomenpräparaten	36
3.10 Fluoreszenz plus Giemsa-Färbung (FGP-Färbung) der Chromosomenpräparate	37

3.11 Auswertung der Chromosomenpräparate	38
3.11.1 Bestimmung des Mitose-, Stimulierungsindex und Zellzyklusverteilung	38
3.11.2 Bestimmung der Schwesterchromatid-Austausche (SCEs)	39
3.11.3 Bestimmung der Chromosomenschäden	39
3.12 Nachweis der Produktion inflammatorischer Zytokine mittels enzymgebundenen Immunoassay (ELISA)	40
3.12.1 Bestimmung des proinflammatorischen Zytokins TNF- α in humanen Monozyten und muriner RAW 264.7 Makrophagen	41
3.12.2 Bestimmung des proinflammatorischen Zytokins Interleukin- β (IL-1 β) in humanen Monozyten und murinen RAW 264.7 Makrophagen	41
3.13 Nachweis der Produktion von Stickstoffmonoxid in murinen RAW 264.7 Makrophagen	42
3.14 Messung der Zellvitalität / metabolischer Aktivität humaner und muriner Makrophagen mittels MTT-Test	42
3.15 Messung der Phagozytoserate humaner Monozyten und muriner RAW 264.7 Makrophagen	42
3.16 Bestimmung der Zellkernflächen humaner Lymphozyten und muriner RAW 264.7 Makrophagen	43
3.17 Apoptosemessung	44
 4. Ergebnisse	 46
4.1 Vorversuche	46
4.1.1 Bestimmung der Zellkernflächen und Trefferzahl in Makrophagen	46
4.1.2 Bestimmung der Zellkernflächen und Trefferzahl in Lymphozyten	48
4.1.3 Wachstumskurven muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung	49
4.1.4 Wachstumskurven humaner B- und T-Lymphozyten nach mitogener Aktivierung	50
4.2 Zellvitalität humaner und muriner Makrophagen nach Exposition ionisierender Strahlung	52
4.2.1 Zellvitalität muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen	52
4.2.2 Zellvitalität muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung mit 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen	54
4.2.3 Zellvitalität humaner Makrophagen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen ..	56
4.2.4 Zellvitalität humaner Makrophagen nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen	57
4.2.5 Zellvitalität humaner Fibroblasten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen	58
4.2.6 Zellvitalität humaner Lymphozyten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen ..	59
4.3 Wirkung ionisierender Strahlen auf die TNF- α -Produktion von Makrophagen	60
4.3.1 TNF- α Produktion muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen	61
4.3.2 TNF- α -Produktion muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung mit 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen	62
4.3.3 TNF- α -Produktion humaner Makrophagen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen	64
4.3.4 TNF- α -Produktion humaner Makrophagen nach Bestrahlung mit 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen	65

4.4 Wirkung ionisierender Strahlen auf die IL-1 β Produktion von Makrophagen	67
4.4.1 IL-1 β -Produktion muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen	67
4.4.2 IL-1 β -Produktion muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung mit 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen	68
4.4.3 IL-1 β Produktion humaner Makrophagen nach Bestrahlung mit 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen	69
4.5 Einfluss ionisierender Strahlung auf die Stickstoff-Monoxid Produktion muriner RAW 264.7 Makrophagen	70
4.5.1 Stickstoff-Monoxid-Produktion muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen	71
4.5.2 Stickstoff-Monoxid-Produktion muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung mit 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen	73
4.6 Phagozytische Aktivität humaner und muriner Makrophagen nach Bestrahlung ..	75
4.6.1 Phagozytische Aktivität muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen	75
4.6.2 Phagozytische Aktivität muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung mit 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen	76
4.6.3 Phagozytische Aktivität humaner Makrophagen nach Bestrahlung mit 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen	78
4.7 Strahlensensitivität primärer humaner B-Lymphozyten	79
4.7.1 Isolierung von B-Lymphozyten mit Schafserthrozyten nach Bestrahlung und Stimulierung	80
4.7.2 Chromosomenschäden in primären human B-Lymphozyten nach Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen	81
4.7.3 Chromosomenschäden in primären human B-Lymphozyten nach Bestrahlung mit 100 MeV/u Kohlenstoffionen	83
4.7.4 Relative Biologische Wirksamkeit (RBW)	84
4.7.5 Sister-Chromatid-Exchanges (SCE) in humanen B- und T-Lymphozyten	85
4.7.6 Stimulierung humaner B- und T-Lymphozyten nach Bestrahlung	87
4.7.7 Mitoseindex und Anzahl von Zellen in der 1. Mitose nach Bestrahlung	88
4.7.8 Verteilung der Lymphozyten-Subpopulationen nach Bestrahlung	89
4.7.9 Apoptoserate humaner B- und T-Lymphozyten nach Bestrahlung	91
4.7.10 Entwicklung von B-Lymphozyten in Phytohämagglutinin-stimulierten Lymphozytenkulturen	92
4.7.11 Apoptoserate von humanen B- und T-Lymphozyten nach PHA-Stimulation	95
5. Diskussion	97
5.1 Allgemeine Zellvitalität von Makrophagen nach Bestrahlung	97
5.2 Inflammatorische Zytokine	98
5.2.1 TNF- α -Produktion	99
5.2.2 IL-1 β	100
5.3 Stickstoffmonoxid (NO)	102
5.4 Phagozytische Aktivität	104
5.5 Zusammenfassung / Aussichten Teil 1: Makrophagen	106
5.6 Strahlensensitivität humaner B-Lymphozyten	108

5.6.1 Chromosomale Aberrationen nach Bestrahlung	109
5.6.2 Mitoseindex und Stimulierung von B-Lymphozyten	110
5.6.3 Schwester-Chromatid-Austausche (SCE).....	111
5.6.4 B-Lymphozyten in PHA-stimulierten Kulturen.....	111
5.6.5 Apoptoseraten von B- und T-Lymphozyten	112
5.7 Zusammenfassung / Aussichten Teil 2: Humane B-Lymphozyten	113
 6. Literaturliste.....	 115
 7. Anhang.....	 131
7.1 Wertetabellen / Tabellenverzeichnis.....	131
7.2 Chemikalienliste	144
7.3 Einweg- und Verbrauchsmaterialien.....	145
7.4 Geräte, Apparaturen und Software	145
7.5 Verwendete Antikörper.....	145
 Lebenslauf.....	 147

1. Zusammenfassung / Abstract

Ziel dieser Arbeit war es, im Rahmen der bei der GSI in Darmstadt durchgeführten Schwerionentherapie mit Kohlenstoffionen die allgemeine Strahlensensitivität humaner Immunzellen zu bestimmen. Untersucht wurden die Zellvitalität, Zytokinproduktion, Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion und die phagozytische Aktivität humaner und muriner Makrophagen, sowie die chromosomale Aberrationsrate primärer, humaner B- und T-Lymphozyten.

Die Untersuchungen zur Zellvitalität humaner und muriner Makrophagen nach Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen und 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen zeigten, dass Makrophagen eine relativ strahlenresistente Zellart sind, verglichen mit Lymphozyten und Fibroblasten. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass weder humane noch murine Makrophagen durch Bestrahlung alleine aktiviert werden und somit keine inflammatorischen Zytokine produzieren. Die Synthese von TNF- α in LPS-aktivierten Makrophagen wurde durch die Bestrahlung nur geringfügig negativ beeinträchtigt. Die IL-1 β Produktion in LPS-aktivierten murinen Zellen wurde durch Röntgenbestrahlung dosisabhängig verstärkt, nach Kohlenstoffionenbestrahlung hingegen dosisabhängig erniedrigt. Gleichzeitig stieg in LPS-aktivierten, mit Kohlenstoffionen bestrahlten murinen Zellen die NO-Produktion dosisabhängig an. Humane Makrophagen produzierten *in vitro* keine messbaren Mengen an NO und ihre LPS-induzierte IL-1 β Produktion stieg nach Bestrahlung leicht an. Weiterhin stieg die phagozytische Aktivität, sowohl in humanen als auch murinen Makrophagen nach Bestrahlung an. 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen waren hierbei effektiver als 250 kV Röntgenstrahlen.

Die Bestimmung der chromosomalen Aberrationsrate erfolgte mit peripheren Blutlymphozyten, die nach Bestrahlung mit Pokeweed-Mitogen (PWA) stimuliert wurden. Durch diese Stimulierung treten sowohl B- als auch T-Lymphozyten in die Mitose ein und können somit auf ihre strahleninduzierten Chromosomenschäden hin untersucht werden. Da B-Zellen ohne Hilfe der T-Zellen nach Stimulierung mit PWA *in vitro* nicht proliferieren, erfolgte die Trennung von B- und T-Zellen erst nach Bestrahlung mit 100 MeV/u Kohlenstoffionen bzw. 250 kV Röntgenstrahlen und anschließender Stimulierung. Die Trennung der B-Zellen von den T-Zellen wurde mit Hilfe von Schafserythrozyten durchgeführt. Humane T-Zellen binden selektiv an die Schafserythrozyten und können durch eine Dichtegradientenzentrifugation von den B-Zellen getrennt werden. Die Untersuchung ergab, dass Kohlenstoffionen bei gleicher Dosis mehr Schäden induzieren als Röntgenstrahlen. Die ermittelte relative biologische Wirkung (RBW)₁₀₀ lag bei 2,5. Weiterhin zeigte sich, dass die chromosomale Aberrationsrate von B-Lymphozyten und T-Lymphozyten gleich ist, sowohl nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen als auch mit Kohlenstoffionen. Es wurden jedoch Unterschiede in der Apoptoserate der beiden Lymphozyten-Subpopulationen gefunden. B-Zellen wiesen eine höhere Apoptoserate auf als T-Zellen. Die Ergebnisse zeigen, dass B-Lymphozyten die gleiche Aberrationsrate aufweisen wie T-Lymphozyten. Somit müssen bereits bestehende Ergebnisse zytogenetischer Messungen, die mit peripheren Blutlymphozyten gewonnen werden und dadurch nicht nur T- sondern auch B-Zellen

enthalten, nicht neu bewertet werden müssen. Ferner unterstreichen die Ergebnisse das größere Potential der Kohlenstoffionen in Bezug auf ihre relative biologische Wirkung.

Abstract

The aim of this work was to determine the general sensitivity of cells of the immune system to irradiation with carbon ions, which was carried out within the framework of radiation therapy at the GSI in Darmstadt. For these studies the effects of irradiation on cell vitality, proinflammatory cytokine production, nitric oxide (NO) production and phagocytic activity of murine and human macrophages were examined. In addition, induction of chromosomal aberrations in primary human B and T lymphocytes after irradiation was investigated.

Cell vitality studies showed that human and murine macrophages are relatively resistant, compared with lymphocytes and fibroblasts, to irradiation with 250 kV X-rays and 9.8 MeV/u carbon ions. It was also determined that neither X-ray nor carbon ion irradiation could induce macrophages to produce either proinflammatory cytokines or NO. The synthesis of tumor necrosis factor (TNF)- α , which was induced by lipopolysaccharide (LPS), was only slightly impaired by irradiation. LPS-induced IL-1 β production in murine macrophages was enhanced in a dosage dependent manner by X-rays, but decreased in a dosage dependent manner after carbon ion irradiation. At the same time, LPS-induced nitric oxide production in these cells was greatly enhanced by carbon ion irradiation. Human macrophages activated by LPS produced no detectable amounts of NO, and IL-1 β production in these cells increased slightly after irradiation. A dosage dependent increase in phagocytic activity occurred in human as well as murine macrophages after irradiation. In this regard, carbon ions were more effective than X-rays.

Determination of chromosomal aberrations was carried out on peripheral blood lymphocytes that were stimulated with pokeweed mitogen (PWA) after irradiation with 250 kV X-rays or 100 MeV/u carbon ions. Stimulation with the mitogen was necessary in order to drive these cells into the mitosis phase so that radiation-induced chromosomal aberrations could be investigated. Since B lymphocytes require the help of T lymphocytes to proliferate after PWA stimulation *in vitro*, the separation of B cells and T cells was carried out after irradiation of peripheral blood lymphocytes and subsequent stimulation with PWA. Separation of the cells was accomplished with the help of sheep red blood cells (SRBC). Human T cells bind selectively to SRBC and can be removed from the B cell population through differential centrifugation. Results of the investigation showed that carbon ion irradiation induced greater damage than X-rays at the same dosage. The relative biological effectiveness (RBE) of carbon ion irradiation in comparison to X-rays for 100 cells in mitosis was 2.5. Furthermore, the number of aberrations detected in B lymphocytes and T lymphocytes was the same after irradiation. However, B cells showed a higher rate of apoptosis than T cells. Since B and T lymphocytes contained the same number of chromosomal aberrations after irradiation, the results of earlier cytogenetic investigations on peripheral blood lymphocytes, which contained not only T cells but also B cells, do not have to be re-assessed. Furthermore, the results of the present investigation underscore the greater potential of carbon ion irradiation compared to X-rays with respect to relative biological effectiveness in radiation therapy.

2. Einleitung

2.1 *Immunsystem*

2.1.1 Strahlenwirkung auf das Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus einem komplexen Netzwerk verschiedenster Immunzellen, die unterschiedliche Aufgaben bei der Bekämpfung von Mikroorganismen, Viren, Giftstoffen und körpereigenen Krebszellen einnehmen. Wie z.B. Untersuchungen mit Überlebenden von Atombombenexplosionen zeigten, kommt es durch die Bestrahlung zu massiven Störungen im Immunsystem. Unter anderem wird die Stimulierbarkeit und Anzahl von nativen T-Zellen herabgesetzt (Kusunoki et al., 2002), die Gesamtzellzahl von B- und T-Lymphozyten verändert (Kusunoki et al., 1998; Gridley & Pecaut, 2006) und chromosomale Aberrationen in hämatopoetischen Stammzellen und peripheren Lymphozyten induziert (Kusunoki et al., 2002). Durch die herabgesetzte Immunfunktion kommt es häufig zu Infektionen und schweren inflammatorischen Reaktionen bei den Überlebenden. Als Folge wurde eine erhöhte Todesrate, hervorgerufen durch koronare Herzerkrankung in Atombomben-Überlebenden festgestellt (Shimuzi et al., 1999). Weiterhin wurden gehäuft Fälle von Neutropenie (Imamura & Kimura, 2000), Meningioma (Shintani et al., 1999), und eine allgemein erhöhte Krebsrate (Mabuchi et al., 1994; Preston et al., 1994, Cologne & Preston, 2000; Preston et al., 2002; Preston et al., 2003) beobachtet. Die Lebenserwartung der Überlebenden ist gegenüber nicht bestrahlten Personen herabgesetzt (Shimizu et al., 1996; Cologne & Preston, 2000).

Auch nach therapeutischen Strahlenbehandlungen können Veränderungen im Immunsystem beobachtet werden, beispielsweise chromosomale Aberrationen in Lymphozyten (Maheet al., 1997). Neben hämatologischen Effekten sind eine Reihe inflammatorischer Reaktionen wie Fibrose, Mukositis und Pneumonitis nach Strahlenexposition beschrieben (De Santis et al., 2005; Mantini et al., 2005; Piotrowski & Milecki, 2005).

Neben diesen negativen Folgen einer Strahlenexposition gibt es auch einige positive Effekte von Strahlung auf das Immunsystem bzw. auf den Gesamtorganismus. Beispielsweise können entzündliche Erkrankung wie Tendinitis, Periarthritis Humeroscapularis und Osteoarthritis mit niedrig dosierten Röntgen- oder Gamma-Strahlentherapien (LD-RT = *Low-Dose Radiotherapy*) erfolgreich behandelt werden (Trott et al., 1994; Leer et al., 1998; Seegenschmiedt et al., 1999; Mucke et al., 2003; Hildebrandt et al., 2003). Der Wirkmechanismus dieser anti-inflammatorischen Strahlentherapie ist noch nicht aufgeklärt. Es gibt jedoch Hinweise, dass die bei den entzündlichen Erkrankungen anhaltende Produktion des inflammatorisch wirkenden Moleküls Stickstoffmonoxid (NO) durch Gewebemakrophagen nach Bestrahlung herabgesetzt wird (Hildebrandt et al., 1998; Rodel et al., 2002; Hildebrandt et al., 2003).

Neben der LD-RT wird zurzeit auch noch die Radon-Therapie bei entzündlichen Erkrankungen wie Morbus-Bechterew, Spondylarthrosen, Osteochondrosen, Sklerodermie, Psoriasis und Ekzeme angewendet. Auch bei der Radontherapie ist der molekulare Wirkmechanismus der Alpha-Teilchen-Bestrahlung noch nicht aufgeklärt (Überblick in: Deetjen et al., 2005).

2.1.2 Zellen des Immunsystems

Das Immunsystem des Menschen besteht aus verschiedenen zellulären und humoralen Komponenten. Man unterscheidet zwischen den so genannten spezifischen und unspezifischen Immunkomponenten. Zellulärer Bestandteil des Immunsystems sind die T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Makrophagen, Granulozyten und Natürliche-Killer-Zellen (NK-Zellen). Die verschiedenen Zelltypen haben unterschiedliche Aufgaben bei der spezifischen und unspezifischen Immunantwort (Abbildung 2.1.1)

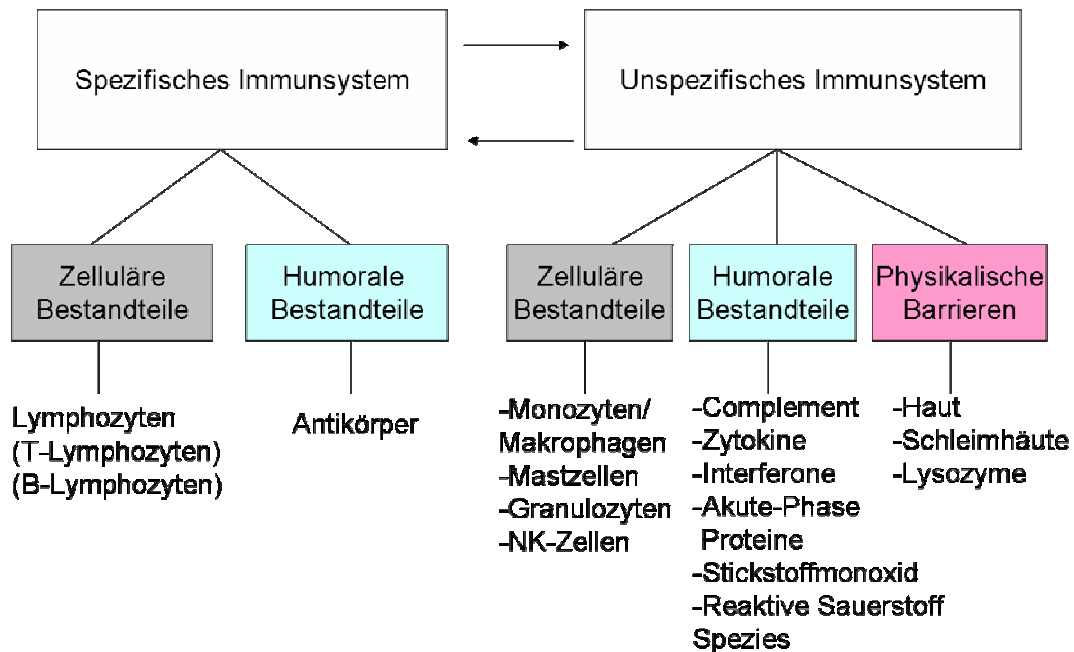


Abb. 2.1.1: Übersicht über die Bestandteile des spezifischen und des unspezifischen Immunsystems. (Für ausführliche Informationen siehe Janeway & Travers, 2002)

Monozyten/Makrophagen und NK-Zellen stellen den wichtigsten Teil der zellulären, unspezifischen Immunsystems dar. Makrophagen sind in der Lage Fremdstoffe wie Bakterien, Pilze, Viren, apoptotische/nekrotische Zellen und körperfremde Partikel zu binden und zu phagozytieren (Abbildung 2.1.2). NK-Zellen erkennen und bekämpfen Virus-infizierte körpereigene Zellen (Überblick in Janeway & Travers, 2002).

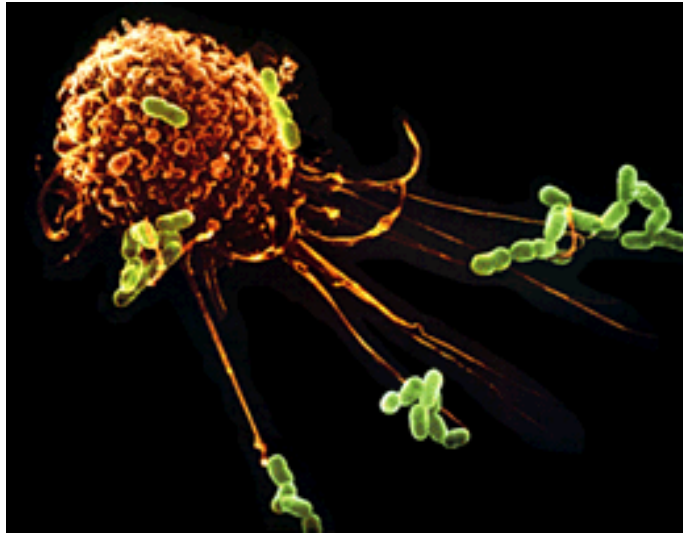


Abb. 2.1.2: Falschfarbendarstellung einer Elektronenmikroskopaufnahme eines Makrophagen, der Bakterien attackiert. Es sind deutlich die Lamellipodien zu sehen, mit denen der Makrophage die stäbchenförmigen Bakterien greift, sie zu sich heran zieht und anschließend phagozytiert. Photo von Lennard Nilsson (National Geographic, Juni 1986, S. 718) © Boehringer Ingelheim International GmbH

Nach der Phagozytose von Fremdstoffen werden diese in speziellen Zellkompartementen, die so genannten Phagosomen enzymatisch abgebaut. Bruchstücke dieser verdauten Partikel werden anschließend von der Zelle mittels spezieller Rezeptormoleküle, den so genannten *major histocompatibility complex-II* (MHC-II) Molekülen, anderen Immunzellen präsentiert, um eine spezifische Immunantwort zu induzieren.

Monozyten entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks und sind die Vorläuferzellen von Gewebemakrophagen. Sie zirkulieren für ca. 2 Tage im Blut und gelangen durch Diapedese (Wanderung durch die Gefäßwände) in das umliegende Gewebe, wo sie durch gewebespezifische Wachstumsfaktoren in Makrophagen ausdifferenzieren (Abbildung 2.1.3 A und B) (Überblick in Janeway & Travers, 2002).

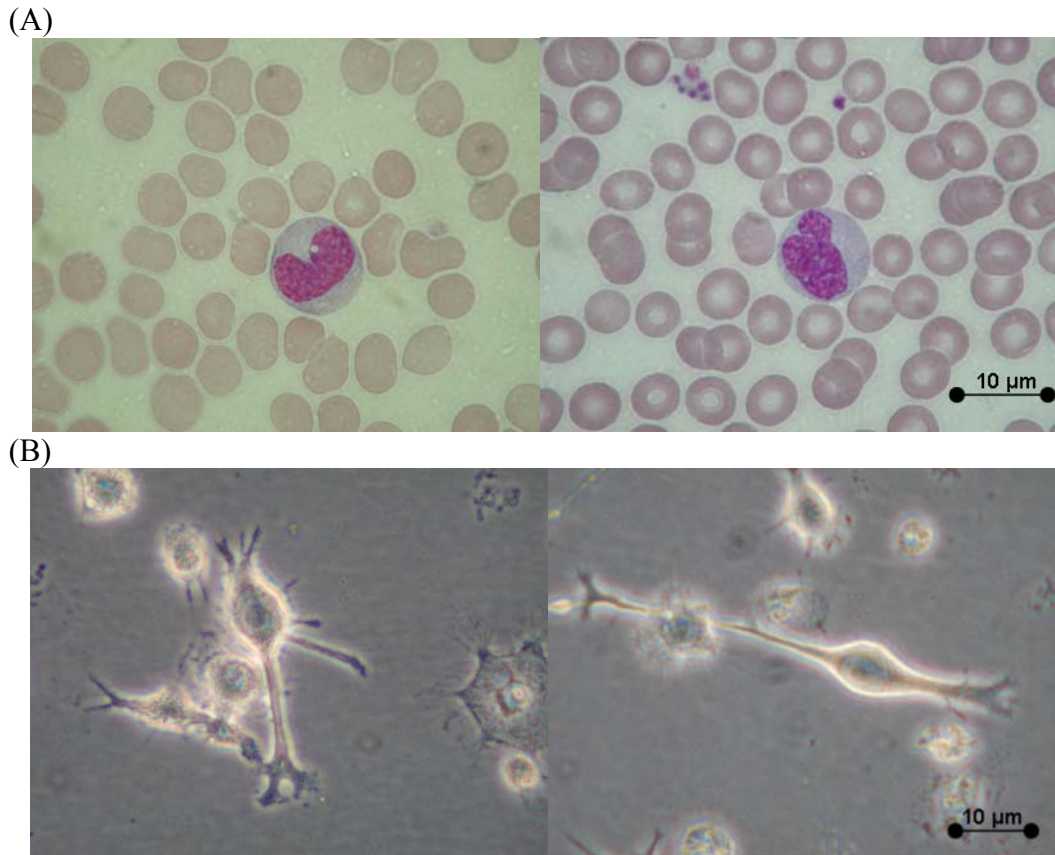


Abb. 2.1.3 (A): Hellfeldaufnahme von Blutmonozyten eines gesunden, männlichen Spenders nach Pappenheimfärbung. Die Monozyten sind als mononukleäre Zellen sichtbar und deutlich größer als die rosa gefärbten Erythrozyten. Im Durchschnitt besitzen die Makrophagen einen Zelldurchmesser von 10 µm -12 µm. Der Zellkern ist dunkel violett angefärbt, das Zytoplasma hellbau. Die Zellkerne der Monozyten sind unregelmäßig geformt. In Abbildung (B) sind humane Monozyten im Phasenkontrastlicht zu sehen, die für 7 Tage *in vitro* in Makrophagen differenziert wurden. Die Makrophagen sind elongiert und haben lange Zellfortsätze gebildet (Lamellipodien). In dieser elongierten Form können die Makrophagen eine Länge von 50 µm bis 80 µm annehmen.

Je nach Art des Gewebes werden die Makrophagen unterschiedlich benannt. Makrophagen in der Leber werden als Kupfferzellen, in der Milz als Uferzellen, in der Lunge als Alveolarmakrophagen und im Gehirn als Mikrogliazellen bezeichnet. Makrophagen können jedoch auch gewebeunspezifisch durch das Bindegewebe wandern, welches ihnen durch die Ausbildung von Zellfortsätzen, so genannte Lamellipodien und Mikrovilli, ermöglicht wird (Klein, 1991; Abbas et al., 1997).

Neben der Phagozytose besitzen Makrophagen die Fähigkeit biologisch aktive Substanzen zu produzieren wie beispielsweise Proteine, Lipide und reaktive Stickstoff- bzw. Sauerstoffspezies. Die Gruppe der Proteine umfasst die inflammatorischen Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), die bei der Entwicklung entzündlicher Prozesse eine wichtige Rolle spielen. Zu den Lipiden gehört das Prostaglandin und Thromboxan, die

ebenso an Entzündungsreaktionen beteiligt sind (Janeway & Travers, 2002). Als reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies treten z.B. das Hyperoxid-Anion, Wasserstoffperoxid und Stickstoffmonoxid in Erscheinung. Diese reaktiven Substanzen wirken toxisch auf Mikroorganismen, können jedoch auch körpereigenes Gewebe schädigen (Rietschel et al., 1993).

Außer den eben genannten Eigenschaften übernehmen Makrophagen zusätzlich die Aufgabe als Antigen-präsentierende Zellen. Die von Makrophagen nach der Phagozytose auf MHC-II-Molekülen präsentierten Antigene werden von T-Lymphozyten erkannt. T-Lymphozyten werden dadurch zur Proliferation angeregt (Abbas et al., 1997).

Die T-Lymphozyten stammen aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark ab und gelangen über die Blutbahn in den Thymus, wo sie schließlich zu funktionsfähigen T-Lymphozyten ausdifferenzieren und wieder in das Blut gelangen. Lymphozyten befinden sich im Blut überwiegend in der G_0/G_1 -Phase, sind relativ klein und besitzen kaum Zytoplasma, bis sie von Makrophagen oder anderen Antigen-präsentierenden Zellen aktiviert werden (Abbildung 2.1.4).

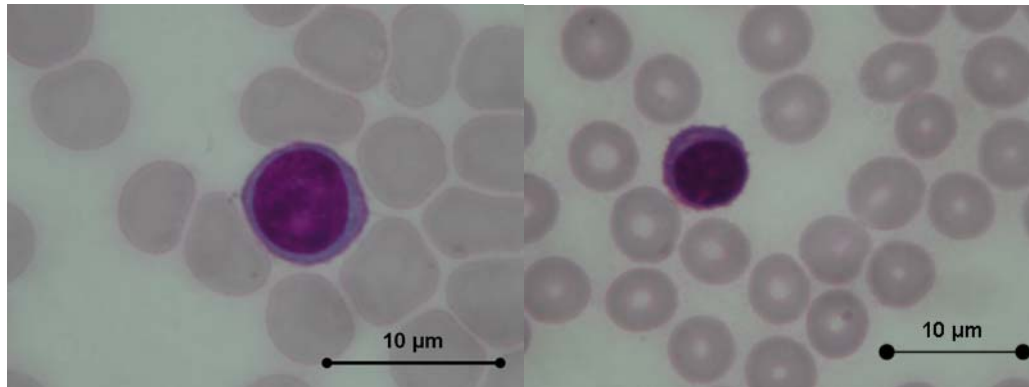


Abb. 2.1.4: Hellfeldaufnahme von Blutlymphozyten nach Pappenheim-Färbung. Der Zellkern ist dunkel violett gefärbt, das Zytoplasma blau. Die Lymphozyten sind kaum größer als die sie umgebenden, schwach rosa gefärbten Erythrozyten. Weiterhin zeigt die Färbung, dass die Lymphozyten wenig Zytoplasma enthalten. Diese Bilder zeigen die typische Morphologie von Lymphozyten im Blut, die sich in der G_0/G_1 -Phase befinden.

Die durch Makrophagen aktivierten T-Lymphozyten sezernieren ihrerseits spezielle Zytokine. Diese Zytokine aktivieren anschließend B-Lymphozyten, die in Vorfeld bereits durch freie Antigene stimuliert wurden, was zur Proliferation und Differenzierung der B-Lymphozyten in Plasmazellen führt. Die Plasmazellen produzieren schließlich Antikörper, die spezifisch gegen ein Antigen gerichtet sind, das sie über membrangebundene Antikörper (B-Zell-Rezeptor) gebunden haben. Die Morphologie einer Plasmazelle ist in Abbildung 2.1.5 gezeigt

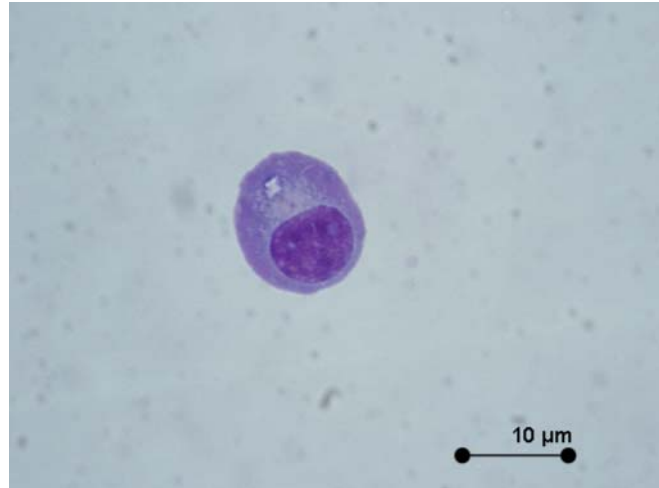


Abb. 2.1.5: Hellfeldaufnahme einer humanen Plasmazelle nach Pappenheim-Färbung. Deutlich ist das vergrößerte Zytosol der Plasmazelle in Vergleich zu G_0/G_1 Lymphozyten zu erkennen. Vor der Ausdifferenzierung von B-Zellen in Plasmazellen sind B-Lymphozyten morphologisch nicht von T-Lymphozyten zu unterscheiden. (Bild aus: Onkodine Bildatlas)

In der Strahlenbiologie werden humane T-Lymphozyten häufig als biologisches Dosimeter verwendet. Anhand der Art und Häufigkeit von strahleninduzierten Chromosomenschäden lassen sich Rückschlüsse auf die applizierte Dosis ziehen (IAEA, 2001). Bei diesen Untersuchungen werden häufig Lymphozytenkulturen verwendet, die neben T- und B-Lymphozyten auch NK-Zellen und Monozyten enthalten. Diese Lymphozytenkulturen zeigten nach Hoch-LET-Bestrahlung eine steigende Aberrationsrate mit steigender Kultivierungsdauer (Lee et al., 2005; Nasanova et al., 2006). Als Grund für die erhöhte Aberrationsrate wurden verstärkte strahleninduzierte Zellzyklus-Verzögerungen diskutiert (George et al., 2001; Ritter et al., 2002, Lee et al., 2005), als auch strahlensensitivere Lymphozyten-Subpopulationen (Hoffmann et al., 2002; Hone et al., 2005). Um zu klären, ob die erhöhte Aberrationsrate durch Unterschiede in der Strahlensensitivität von Lymphozyten-Subpopulationen hervorgerufen wird, wurde in der vorliegenden Arbeit die Strahlensensitivität von T- und B-Lymphozyten auf der Ebene chromosomaler Aberrationen untersucht.

2.2 Proinflammatorische Zytokine und Stickstoffmonoxid (NO)

Zytokine sind Protein hormone, die von immunkompetenten Zellen sezerniert werden. Sie dienen als Botenstoff im Immunsystem und besitzen wichtige regulatorische Funktionen. Ihre Wirkung erfolgt durch Binding an spezielle Oberflächenrezeptoren der Zielzellen (Abbas et al., 1997; Janeway & Travers, 2002). In der vorliegenden Arbeit wird die Modulation der Produktion der inflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α sowie von Stickstoffmonoxid (NO) in humanen und murinen Makrophagen nach Strahlenexposition untersucht. Deshalb beschränkt sich die nähere Beschreibung auf diese drei Stoffe.

2.2.1 Interleukin-1 β (IL-1 β)

IL-1 β wird von mononukleären Phagozyten (Monozyten/Makrophagen) exprimiert, nachdem diese durch Kontakt mit Mikroorganismen (Bakterien/Pilzen/Viren) bzw. deren Zellkomponenten wie das Lipopolysaccharid (LPS), aktiviert wurden. Neben den mononukleären Phagozyten können jedoch auch eine Reihe weiterer Zelltypen wie Epithelzellen und Endothelzellen im geringen Umfang IL-1 β produzieren (Abbas et al., 1997). Nach Bildung von pro-IL-1 β im Zytosol und Prozessierung von pro-IL-1 β durch das *IL-1 β -converting-enzyme* (ICE, auch Caspase 1 genannt), wird das fertige IL-1 β sezerniert.

Als Zielzellen fungieren viele andere Zellen im Organismus. Das Zytokin wirkt als Aktivator für T-Lymphozyten, wodurch diese zur Proliferation angeregt werden. B-Lymphozyten benötigen IL-1 β bei der Reifung der Prä-B-Zelle zur B-Zelle, sowie nach Antigenkontakt für die Proliferation der reifen B-Zelle (Janeway & Travers, 2002). Weiterhin wirkt IL-1 β auf Hepatozyten in der Leber, was zur Bildung von Akut-Phase-Proteinen führt. IL-1 β agiert ebenfalls als allgemeines Pyrogen (Fieber-induzierende Substanz), indem es im Gehirn die Hypothalamuszellen zur vermehrten Synthese von Fieber-induzierende Prostaglandinen angeregt (Steinman, 2004). In Tierversuchen, sowie in *in vitro*-Versuchen mit humanen Zellen konnte gezeigt werden, dass IL-1 β nach Bestrahlung höher exprimiert wurde, und bei der Ausbildung einer strahleninduzierten Fibrose beteiligt ist (Liu et al., 2006; Okunieff et al., 2006; Schaeue et al., 2005; Gridley et al., 1998).

2.2.2 Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)

TNF- α ist ein pleiotropes Zytokin und wurde ursprünglich als wirksame Substanz im Serum LPS-behandelter Tiere als Auslöser von Tumornekrosen entdeckt (Old, 1988). Bei diesen Versuchen schädigte das TNF- α die Endothelwände von Blutgefäßen, die den Tumor durchdringen, derartig, dass der Tumor unterversorgt wurde und abstarb (Schwartzman-Reaktion, Abbas et al., 1997).

Ebenso wie IL-1 β kann es von Monozyten/Makrophagen gebildet werden, wobei dieses wiederum sowohl parakrin als auch autokrin aktivierend auf andere Monozyten/Makrophagen wirkt. Es wirkt wie IL-1 β als allgemeiner Vermittler einer Immunantwort durch die Aktivierung von T- und B-Lymphozyten, sowie als Fieber-auslösendes-Protein. Neben den Monozyten/Makrophagen sind Antigen-stimulierte T-Zellen, aktivierte NK-Zellen und Mastzellen in der Lage, TNF- α zu produzieren und zu sezernieren (Klein, 1991; Abbas, 2003; Steinman, 2007). In der sezernierten Form stellt TNF- α ein stabiles Homodimer dar. Neben den Fieber-induzierenden und Lymphozyten-aktivierenden Eigenschaften besitzt TNF- α die Fähigkeit, Apoptose auszulösen. Weiterhin wurde festgestellt, dass TNF- α als auch IL-1 β an einer Reihe von Autoimmunerkrankungen wie z.B. Multiple Sklerose (MS) beteiligt ist. Ebenso ist TNF- α und IL-1 β bei entzündlichen Erkrankungen wie Fibrose, Mukositis oder Pneumonitis, die als Nebenwirkungen bei Strahlentherapien auftreten, beteiligt (Haase et al., 2004; Girinsky et al., 1997; Rubin et al., 1992; Pons et al., 1997; Cole et al., 1993).

2.2.3 Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein freies Radikal, das von aktivierten Monozyten/Makrophagen produziert wird, sowie in geringem Umfang auch von Endothelzellen und Neuronen. Es wird durch die Wirkung so genannter Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) produziert. Man unterscheidet zwischen drei Isoformen der NOS (Übersicht in: Janeway et al., 2002; Abbas et al., 1997). Die endotheliale NOS (eNOS) wird vor allem von Endothelzellen gebildet und bewirkt durch die Produktion von geringen Mengen an NO eine Relaxion der glatten Gefäßmuskulatur. Dies kann zu Blutdruckabsenkung führen und wird deshalb auch therapeutisch durch die Gabe von NO bildenden Medikamenten wie Amylnitrit und Nitroglycerin bei Herzbeschwerden und Bluthochdruck angewendet (Bredt & Snyder, 1994). Die neuronale NOS (nNOS) wird in Neuronen exprimiert. Das durch die nNOS gebildete NO dient wahrscheinlich als schnell diffundierender Botenstoff im Gehirn. Die induzierbare NOS (iNOS) wird vor allem von aktivierten Monozyten/Makrophagen gebildet, die in der Lage sind, große Mengen an NO zu produzieren. Das gebildete NO dient als antimikrobieller Stoff bei der Bekämpfung von Mikroorganismen im Körper, aber auch bei der Bekämpfung von Tumorzellen (Tarr et al., 2006). NO ist weiterhin in der Lage, die Produktion von Zytokinen direkt zu beeinflussen (Ryan et al., 2004; Foley & O'Farrel, 2003; Forman & Torres., 2001a, 2001b).

Das NO kann durch Zellmembranen hindurch diffundieren, da es elektrisch neutral geladen ist. Obwohl NO ein ungepaartes Elektronenpaar aufweist und damit ein Radikal ist, besitzt NO eine relativ lange Halbwertszeit von 2-3 Sekunden in biologischen Systemen (Hakim et al. 1996). Bedingt durch die lange Halbwertszeit kann ein NO-Molekül bis zu 200 µm weit diffundieren (Wood & Garthwaite, 1994). Weiterhin wirkt NO sensibilisierend auf Zellen gegenüber ionisierender Strahlung, gemessen anhand des Zellüberlebens sowie Induktion von DNA-Doppelstrang- und Einzelstrangbrüchen (Wardman et al., 2007; Wardman, 2007).

2.2.4 Biologische Wirkung der inflammatorischen Zytokine

Die biologischen Wirkungen von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β und TNF- α umfassen sowohl positive Effekte wie Aktivierung/Stimulierung des Immunsystem und leichtes Fieber, als auch negative Effekte wie Gewebeerstörung, septischer Schock und sogar den Tod (Old, 1988; Dinarello, 1991). Die jeweiligen Auswirkungen hängen von der Menge der produzierten Zytokine ab, als auch von der Zeit, in der diese gebildet werden (Abbildung 2.2.4)

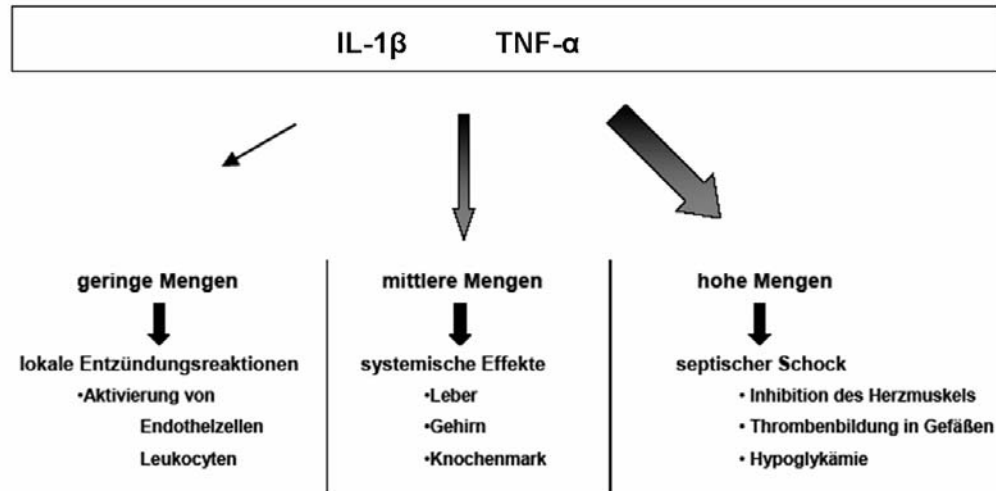


Abb. 2.2.4: Schematisch dargestellt sind die Effekte proinflammatorischer Zytokine. Makrophagen sezernieren nach Aktivierung z.B. durch LPS proinflammatorische Zytokine. Diese Zytokine führen in moderaten Mengen zu lokal begrenzten Entzündungsreaktionen. In mittleren oder hohen Dosen jedoch können diese Zytokine über den Blutkreislauf systemische Effekte auslösen, die bis zu septischen Schock und sogar zum Tode führen können. (Abbas et al., 1997; modifiziert)

Wie in Abbildung 2.2.4 gezeigt, führen geringe Mengen an produzierten Zytokinen zu lokal begrenzten Reaktionen. Sind die Zytokinmengen dagegen erhöht, kann es zu systemischen Effekten wie Fieber, septischer Schock und Tode kommen. Lokal begrenzte Entzündungsreaktionen können jedoch auch schädliche Auswirkungen haben, wenn diese Entzündungen dauerhaft vorliegen. Dies ist z.B. der Fall bei entzündlichen Gelenkerkrankungen wie Arthritis. Eine dauerhafte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und vor allem NO zerstört mit der Zeit das umliegende Gewebe.

2.3 Strahlenbiologische Grundlagen

Man unterscheidet in der Strahlenbiologie zwischen dünn ionisierender (Röntgen-, Gammastrahlen, Elektronen) und dicht ionisierender Strahlung (Neutronen, Protonen, schwere Ionen). Bei Röntgen- und Gammastrahlen handelt es sich um Photonenstrahlung, bei Elektronen, Neutronen, Protonen und schweren Ionen um Teilchenstrahlung.

Treffen diese Strahlen auf Materie und besitzen dazu noch eine Energie von mehr als 10 eV (Elektronenvolt) sind diese Strahlen in der Lage, Materie bzw. Moleküle zu ionisieren. Bei der Ionisation werden Elektronen aus der umgebenden Materie herausgelöst. Sind diese Elektronen Bestandteil einer kovalenten Bindung können chemische Bindungen gebrochen werden. Durch die Ionisation geben die Strahlen Energie an die umgebende Materie ab. Die räumliche Verteilung der Energieabgabe und die damit induzierten Ionisationsereignisse sind für verschiedene Arten von Strahlung unterschiedlich (Kraft, 1990; Krämer & Kraft, 1994; Scholz, 2003). Die Unterschiede in der Energieabgabe an Materie führen weiterhin zu starken

Unterschieden in der biologischen Wirkung dieser Strahlen (Übersicht in Hall et al., 2005). Ionisierende Strahlung kann in biologischen Systemen verschiedene Effekte wie Chromosomenaberrationen und DNA-Mutationen auszulösen, die zu Zelltransformation sowie Zelltod führen können (siehe dazu Abschnitt 2.3).

Als Maß für die Energie Abgabe wird der so genannte Lineare-Energie-Transfer (LET) herangezogen. Die Einheit des LET ist $[\text{keV}/\mu\text{m}]$. Sie gibt an, wie viel Energie des Primärstrahls pro zurückgelegte Wegstrecke an die umgebende Materie abgegeben wird. Für die schwere eines biologischen Schadens ist die Ionisationsdichte wichtig. Sie hängt vom LET und der Querschnittsfläche einer Spur ab, über die die Ionisationen verteilt wird.

Bei elektromagnetischen Strahlen erfolgt die Ionisation hauptsächlich durch den Comptoneffekt, den Photoeffekt und die Paarbildung. Die Ionisation und damit die Freisetzung von sekundären Elektronen wird bei elektromagnetischer Strahlung stochastisch verteilt (Kiefer et al., 1989; Hall et al., 2005).

Ionenstrahlen erzeugen entlang ihrer Flugbahn eine dichte Spur von Ionisationsereignissen, hauptsächlich hervorgerufen durch Coulomb-Kräfte (Kraft, 1987). Abbildung 2.3.1 zeigt die hervorgerufenen Ionisationsereignisse zweier Kohlenstoffstrahlen unterschiedlicher Energien. Bei dicht-ionisierender Strahlung werden durch die Wechselwirkung mit den Atomen der durchdrungenen Materie δ -Elektronen aus der Atomhülle emittiert. Ein Großteil der Energie des Projektils wird somit als kinetische Energie auf diese δ -Elektronen übertragen.

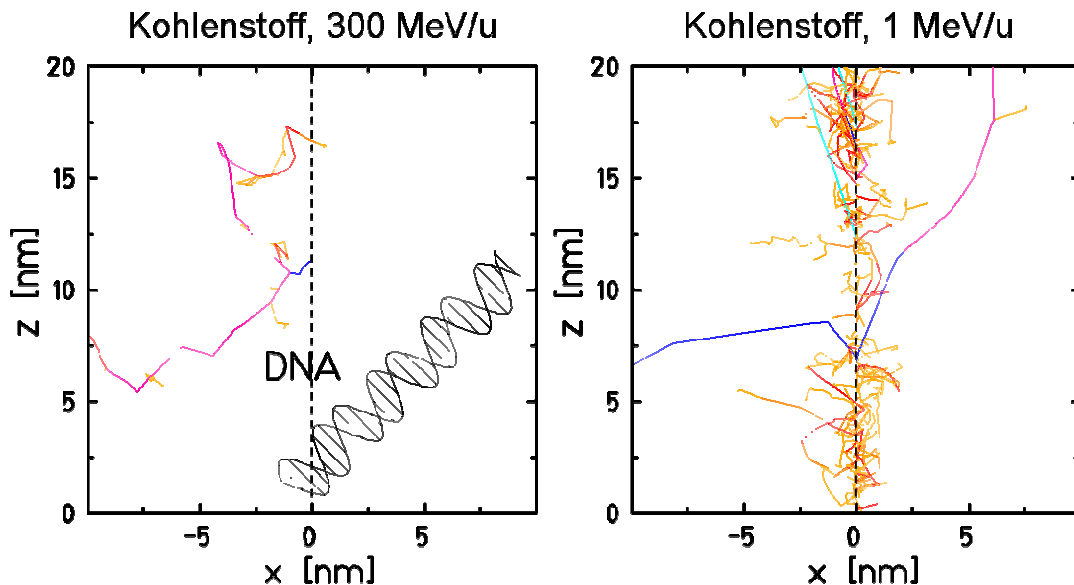


Abb. 2.3.1: Simulation von Ionisationsereignissen entlang einer Teilchenspur von Kohlenstoffionen mit hoher Energie (300 MeV/u, linke Abbildung) und niedriger Energie (1 MeV/u, rechte Abbildung). Der Ionendurchgang ist schematisch mit einer unterbrochenen Linie gekennzeichnet. Als Größenvergleich ist ein DNA-Modell eingezeichnet. Bei hohen Energien werden weniger Ionisationsereignisse ausgelöst als bei niedriger Energie, da der LET mit steigender Energie abnimmt (aus: Krämer & Kraft, 1994).

Die Reichweite der erzeugten δ -Elektronen ist relativ gering im Vergleich zur Reichweite des Primärteilchens. Die maximale Reichweite der erzeugten δ -Elektronen hängt direkt von der Energie des Primärstrahls ab. Je größer die

kinetische Energie des eingestrahnten Teilchens ist, desto größer ist die maximale Reichweite der heraus gelösten Elektronen. Diese Anhäufung von Ionisationsereignissen in einem relativ kleinen Volumen ist für die erhöhte Relative Biologische Wirksamkeit (RBW, siehe Abschnitt 2.4) von Ionenstrahlen verantwortlich. Die erhöhte Ionisationsdichte längs der Teilchenspur führt zu Schadensanhäufung in der DNA, zu so genannte *Clustered-Lesions* (Ward, 1994).

2.4 Dosis, Fluenz und RBW

Als Maß für die absorbierte Energie gilt die Dosis. Sie ist definiert als die deponierte Energie pro Masseneinheit. Die Dosis wird in Gray [Gy] abgegeben (Formel 1) (IRCU Report Nr. 60, 1998).

Formel 1:

$$D[Gy] = \Delta E_{abs} / \Delta m$$

D [Gy] = Dosis in Gray

ΔE_{abs} = Absorbierte Energie in Joule

Δm = Masse in Kg

Bei Verwendung von Teilchenstrahlung ist die Dosis von der Anzahl der eingestrahnten Teilchen abhängig. Als Maß für die Menge an applizierten Teilchen gilt die Fluenz [F]. Der Zusammenhang von Dosis und Fluenz bei Partikelstrahlung ist in Formel 2 dargestellt.

Formel 2:

$$D = 1,602 * 10^{-9} * LET * F * 1 / \rho$$

D = Dosis [Gy]

LET = Linearer Energie Transfer [keV/ μ m]

F = Teilchenfluenz [1/cm²]

P = Dichte [g/cm³]

Für die Bewertung der biologischen Wirkung von Teilchenstrahlen ist es nötig, die Anzahl der Teilchendurchgänge pro Zelle zu kennen, da bei der Verwendung kleiner Fluenzen niederenergetischer Teilchenstrahlung möglicherweise Teile der Zellpopulation nicht getroffen werden. Die Anzahl der Teilchendurchgänge pro Zelle folgt einer Poisson-Verteilung (Hall, 2005). Die Verteilung von auftreffenden Partikeln in einer vorbestimmten Fläche lässt sich in Abhängigkeit der applizierten Dosis bzw. Fluenz mit folgender Formel darstellen (Formel 3).

Formel 3:

$$P_{\lambda}(n) = \frac{\lambda^n}{n!} e^{-\lambda}, \text{ mit } \lambda = AF$$

P = Wahrscheinlichkeit für n Treffer

A = vorgegebene Fläche (z.B. Zellkernfläche)

F = Fluenz

λ = Durchschnittliche Anzahl an Partikeltreffer pro Zellkern

In Abbildung 2.4.1 ist die Wahrscheinlichkeitsverteilung von Zellkerntreffern mit niederenergetischen Ionen in Abhängigkeit der Dosis dargestellt. Verwendet wurde eine Zellkernfläche von $22 \mu\text{m}^2$, da dieser Wert mit guter Annäherung der durchschnittlichen Zellkerngröße von Lymphozyten entspricht (Janeway et al.2002).

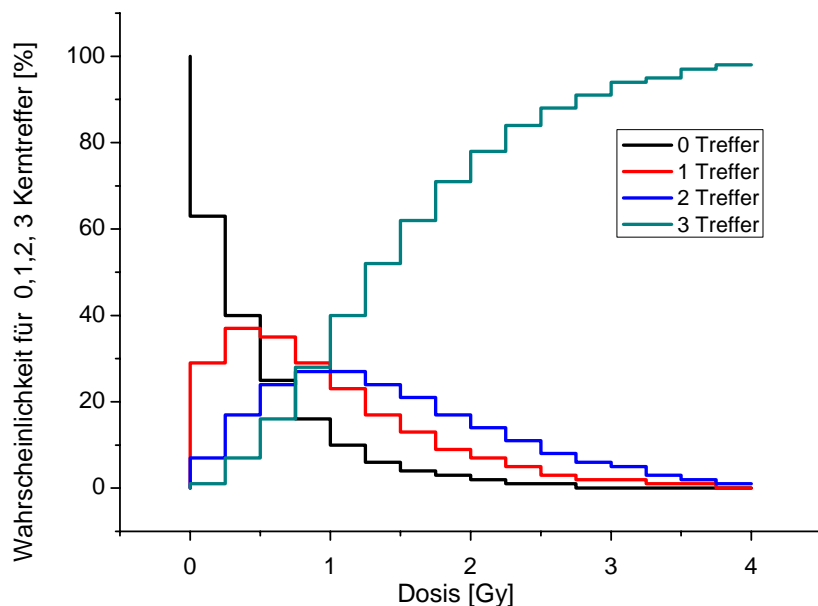


Abb. 2.4.1: Verteilung der Kerntrefferwahrscheinlichkeit für 0, 1, 2 und 3 Treffer pro Zellkern. Als Zellkerngröße wurde $50 \mu\text{m}^2$ veranschlagt. Die Wahrscheinlichkeit für 0 Kerntreffer sinkt exponentiell mit steigender Dosis (steigender Fluenz). Nach einer Dosis von 2 Gy ($7,35 \times 10^6$ Teilchen pro cm^2) sind nur noch ca. 3 % der Kerne ohne Treffer geblieben. Die Berechnung erfolgte für Kohlenstoffionen mit der Energie von 9,8 MeV/u [LET~170 keV/ μm].

Durch die unterschiedliche Energiedeposition von locker und dicht ionisierender Strahlung führt die Applikation derselben Dosis zu quantitativen und qualitativen Unterschieden in der biologischen Strahlenantwort. Mit der RBW lassen sich die unterschiedlichen Effekte von locker und dicht ionisierender Strahlung quantifizieren. Als Referenzstrahlung werden meist 250 kV Röntgenstrahlen benutzt. Errechnet wird die RBW aus dem Verhältnis der absorbierten Dosis der Referenzstrahlung und der Dosis der Teststrahlung, bei der der gleiche biologische Effekt ausgelöst wird (Formel 4) (IRCU Report Nr. 60, 1998). Vergleicht man Dosis-Effekt-Kurven mit unterschiedlichen Kurvenverläufen, kann der RBW je nach betrachtetem Punkt in der Kurve einen anderen Wert haben (Abbildung 2.4.2).

Dies liegt vor allem an der ausgeprägten Schulterkurve bei dünn ionisierender Strahlung. Die in Abbildung 2.4.2 dargestellte Überlebenskurve zeigt eine hohe RBW im Schulterbereich der Röntgenkurve. Wenn Zellen gegenüber Röntgenstrahlung sehr resistent sind, ist die Schulter der Dosis-Effekt Kurve sehr ausgeprägt. Aus diesem Grund muss der Grad des Effekts, zu dem der RBW bestimmt werden soll, genau definiert werden.

Formel 4:

$$RBW = D_{\gamma} / D_I \Big|_{Isoeffekt}$$

RBW = Relative Biologische Wirksamkeit

D_{γ} = Absorbierte Dosis der Referenzstrahlung mit gleicher biologischer Wirkung

D_I = Absorbierte Dosis der Teststrahlung mit gleicher biologischer Wirkung

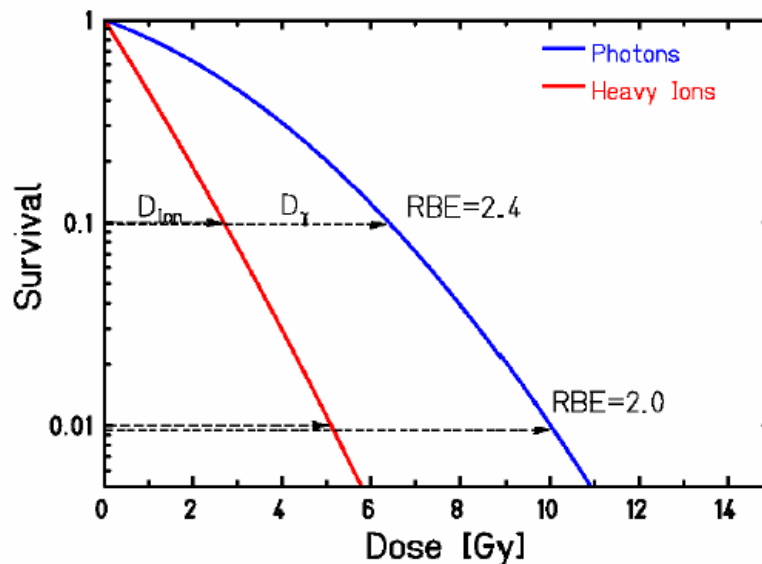


Abb. 2.4.2: Ermittlung der Relativen Biologischen Wirksamkeit (RBW/RBE) von schweren Ionen bei 10 % Überleben und 1 % Überleben.

Die RBW hängt stark von der Ordnungszahl der verwendeten Teilchen, deren Energie und vom LET ab. Teilchenstrahlen mit gleichem LET können unterschiedliche RBW besitzen (Abbildung 2.4.3). Neben dem LET gibt es eine Reihe weiterer Faktoren, die den RBW beeinflussen. Dazu gehören das Alter und die Reparaturkapazität der Zelle, die Anwesenheit von Scavenger-Molekülen, pH-Wert, Temperatur und O_2 -Versorgung (Hall, 2005).

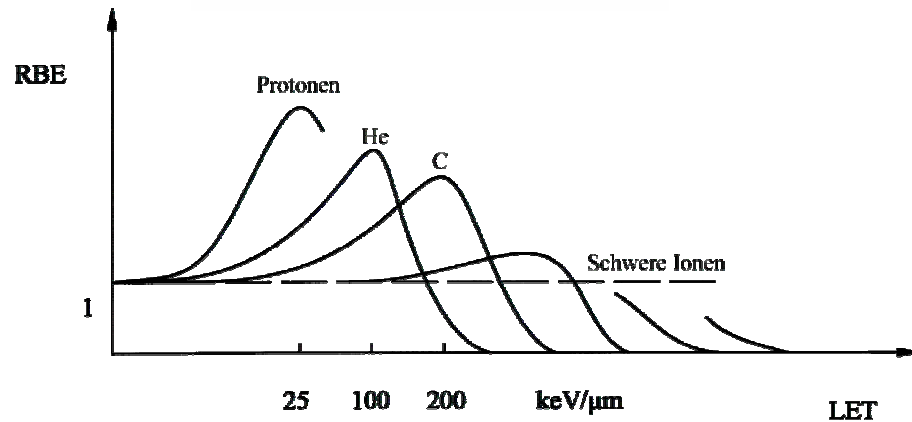


Abb. 2.4.3: Teilchenabhängigkeit der Relativen Biologischen Wirksamkeit (RBW/RBE) bei unterschiedlichen Werten des Linearen Energie Transfers (LET). Mit zunehmender Ordnungszahl verschiebt sich das RBW-Maximum zu höheren LETs (Bild: GSI.de)

2.5 Biologische Strahlenschäden

Die biologische Wirkung der ionisierenden Strahlen beruht hauptsächlich auf der Schädigung der zelleigenen DNA (Munro, 1970a, 1970b). Als Schäden können sowohl Basenmodifikationen, DNA-Protein-Crosslinks, Einzelstrangbrüche und Doppelstrangbrüche auftreten, wobei der Doppelstrangbruch der schwerwiegendste Schaden für eine Zelle ist (Abbildung 2.5.1) (Hall, 2005).

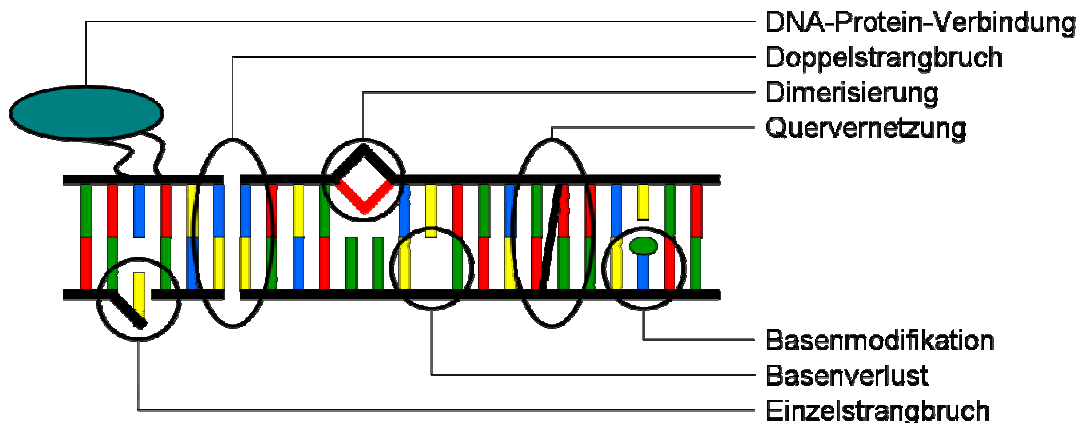


Abb. 2.5.1: Schematische Darstellung der verschiedenen strahleninduzierten DNA-Schäden (Abbildung nach Scholz, 2003; modifiziert)

Für die Reparatur solcher Schäden stehen der Zelle verschiedene Reparaturmechanismen zur Verfügung. Für die Reparatur von Basenschäden und Einzelstrangbrüchen ist die so genannte Basenexzisionsreparatur (BER)

verantwortlich, für die Beseitigung von Doppelstrangbrüchen die Homologe Rekombination (HR) und das *Non-Homologous-End-Joining* (NHEJ) (Übersicht in Hoeijmakers, 2001; Cornforth, 2006). Die HR wird von Zellen während der S-Phase bzw. G₂-Phase des Zellzyklus benutzt, da während dieser Zyklusphase komplementäre, homologe DNA-Abschnitte des DNA-Doppelstrangs vorliegen (Johnson & Jasin, 2000). Die HJ ist somit prinzipiell fehlerfrei.

Das NHEJ stellt den Haupt-Reparaturweg in einer Zelle da. Das NHEJ benötigt keine Matrize für die Reparatur und ist deshalb vor allem während der G₀/G₁-Phase der hauptsächliche Doppelstrang-Reparaturweg. Während der NHEJ-Reparatur werden zwei freie DNA-Enden miteinander verknüpft, dabei wird jedoch nicht sichergestellt, dass diese beiden Ende ursprünglich zusammen gehörten. Das NHEJ ist also im Prinzip fehleranfällig.

Weiterhin bleiben Doppelstrangbrüche, die durch Hoch-LET Bestrahlung ausgelöst werden, länger unrepariert als solche, die durch Röntgenstrahlen oder Gamma-Strahlen ausgelöst werden (Rydberg et al., 1994, 2005; Heilmann et al., 1996). Zusätzlich ist die Rate an fehl-verknüpften, freien DNA-Enden nach Hoch-LET Bestrahlung größer als nach Bestrahlung mit Röntgen- oder Gamma-Strahlen (Rydberg et al., 2005).

Durch nicht reparierte oder fehl-reparierte Strangbrüche können strukturelle Chromosomenschäden entstehen. Bei der Untersuchung von Strahlenwirkung auf eine Zelle wird das gesamte Spektrum von Chromosomenschäden betrachtet, das je nach verwendeter Strahlung sehr unterschiedlich sein kann. Durch die hohe Ionisationsdichte bei Hoch-LET-Bestrahlung entsteht ein anderes Schadensbild als nach Niedrig-LET-Strahlung (Griffin et al., 1995; Ritter et al., 1996; Nasonova et al., 1998; Anderson et al., 2000; Nasanova et al., 2001).

2.6 Tiefendosisprofil ionisierender Strahlung

Photonenstrahlung erzeugen beim Durchdringen von Materie stochastisch verteilte Ionisationsereignisse. Je nach verwendeter Photonenenergie nimmt die deponierte Dosis nach Überwindung des Aufbaueffekts exponentiell ab (Abbildung 2.6.1). Ionenstrahlen zeigen hingegen ein invertiertes Tiefendosisprofil. Das Maximum der Dosis wird bei Ionenstrahlen am Ende der Reichweite des jeweiligen Ionenstrahls, im so genannten Bragg-Maximum (Bragg-Peak) erreicht.

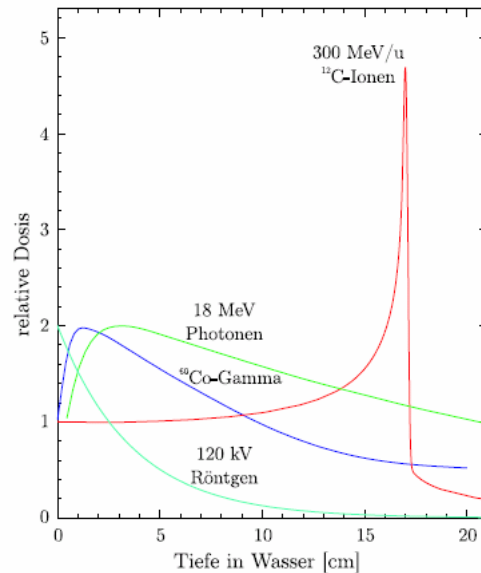


Abb. 2.6.1: Tiefendosisprofil unterschiedlicher Strahlenarten. Dargestellt sind drei Photonenstrahlen: 120 kV Röntgenstrahlen, ^{60}Co - γ -Strahlen und 18 MeV Bremsstrahlung. Die deponierte Dosis von 120 kV Röntgenstrahlen nimmt nach Eintritt in das Target exponentiell ab. Nach Überwindung des Ausbaueffekts nimmt die deponierte Dosis von ^{60}Co - γ -Strahlen und 18 MeV Bremsstrahlen mit zunehmender Eindringtiefe deutlich ab. Die Ionenstrahlen, hier 300 MeV/u Kohlenstoffionen, deponieren zuerst nur relativ wenig Dosis im Eingangsbereich. Erst nach Erreichen der maximalen Eindringtiefe wird die meiste Dosis im Bragg-Maximum deponiert (aus: Weber et al., 1996).

Die Eindringtiefe von Ionenstrahlen ist von der kinetischen Energie der Ionen abhängig. Je höher die kinetische Energie, also deren Geschwindigkeit, desto tiefer können sie in Materie eindringen. In Abbildung 2.6.2 sind die Eindringtiefen von Kohlenstoffionenstrahlen unterschiedlicher Energien in Wasser dargestellt. Die günstige Tiefendosisverteilung und die erhöhten RBW-Werte am Ende der Reichweite von Ionenstrahlen sind die Grundlage der bei der GSI in Darmstadt entwickelten Schwerionentherapie.

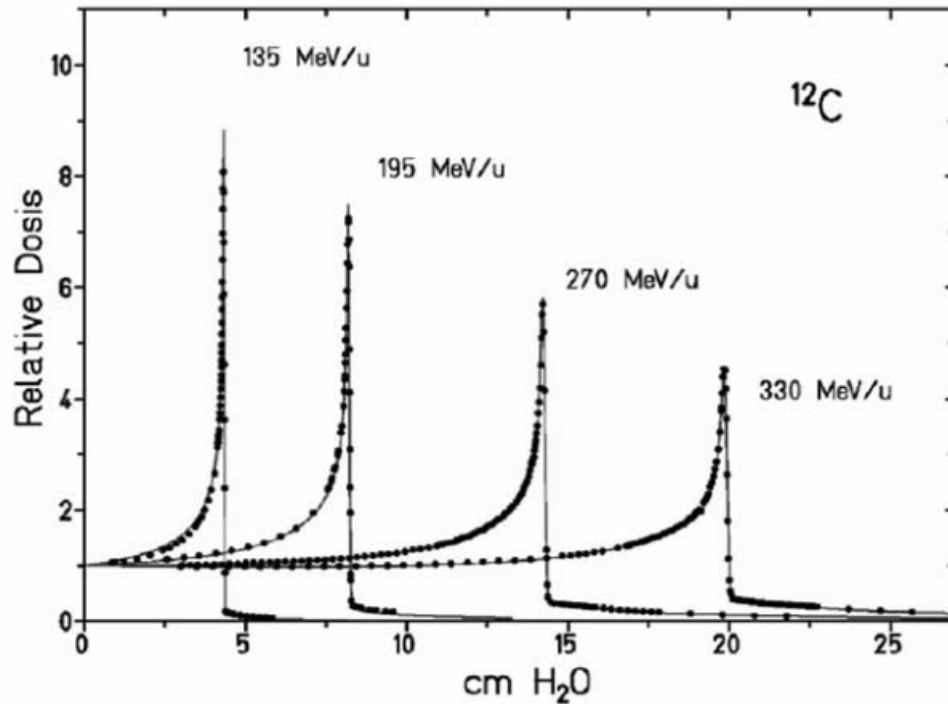


Abb. 2.6.2: Tiefendosisprofil von Kohlenstoffionenstrahlen mit Energien von 135 MeV/u bis 330 MeV/u. Die maximale Eindringtiefe nimmt mit steigender kinetischer Energie zu. 135 MeV/u Kohlenstoffionen stoppen nach ca. 4,5 cm wohingegen 330 MeV/u Kohlenstoffionen erst nach ca. 20 cm stoppen. (Bild: www.GSI.de)

2.7 Tumorthherapie mit schweren Ionen bei der GSI

Seit 1997 wird bei der GSI in Darmstadt eine neuartige Strahlentherapie mit beschleunigten Kohlenstoffionen durchgeführt. Kohlenstoffionen eignen sich durch ihr günstiges Tiefendosisprofil und durch ihre erhöhte RBW im Bragg-Maximum sehr gut als Therapiestahl (Kraft, 2000) (Abbildung 2.7.1, siehe auch Abbildung 2.7.1).

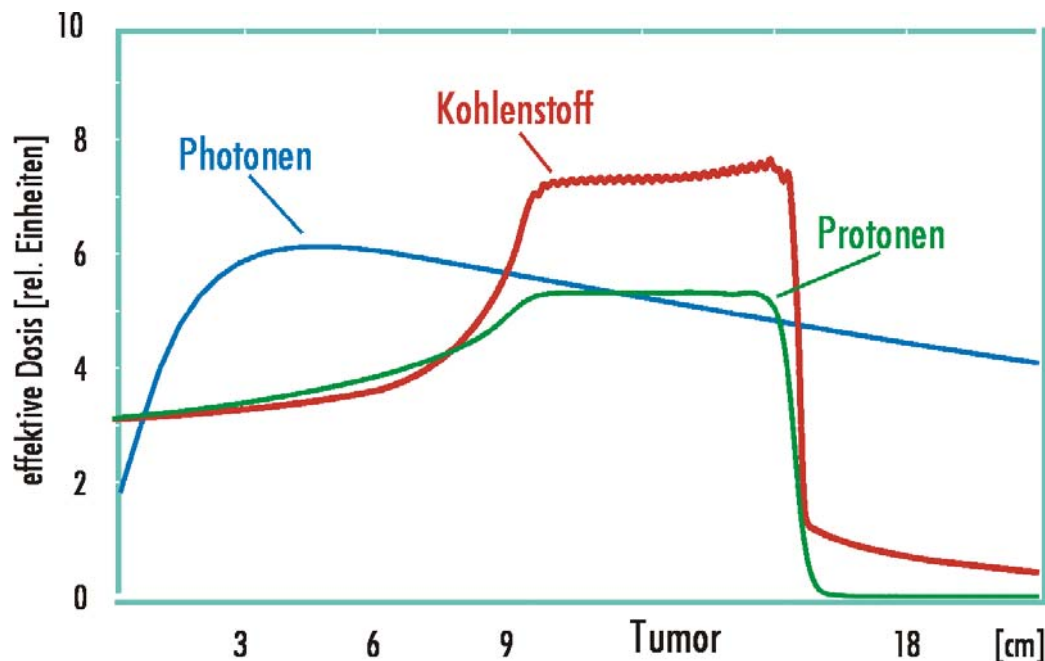


Abb. 2.7.1: Schematische Darstellung von Vorteilen einer Kohlenstofftherapie gegenüber einer klassischen Strahlentherapie mit Photonen und gegenüber einer Protonentherapie. Aufgezeichnet ist die effektive Dosis gegen die Eindringtiefe der verschiedenen Strahlenarten. In einer Tiefe von 9 cm beginnt in dieser Darstellung ein Tumor, der bis in eine Tiefe von ca. 15 cm reicht. Mit einem Kohlenstoffionenstrahl ist es möglich eine hohe lokale Dosis im Tumor zu applizieren, und dabei das gesunde Gewebe vor dem Tumor erheblich weniger zu belasten. (Bildnachweis: GSI.de)

An der GSI in Zusammenarbeit mit der Heidelberger Strahlenklinik, dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg und den Forschungszentrum Dresden, werden Tumorpatienten mit Kohlenstoffionen behandelt. Therapiert werden vor allem langsam wachsende, strahlenresistente Tumore im Kopf-Hals-Bereich, hauptsächlich Chordome, Chondrosarkome und Adenoidzystische Karzinome. Im Juni 2006 wurde eine klinische Studie mit Prostatakarzinomen begonnen. Bisher wurden über 300 Patienten erfolgreich bestrahlt (Schulz-Ertner et al., 2004; 2006; 2007). Weltweit gibt es zurzeit nur zwei weitere Anlagen, in der eine Kohlenstoffionentherapie durchgeführt wird (Chiba und Hyogo, Japan). Durch die bei der GSI verwendete intensitätsmodulierte, aktive Strahlführung mittels Raster-Scan-Verfahren ist es möglich, den Tumor sehr genau zu bestrahlen und dabei das umliegende, gesunde Gewebe größtmöglich zu schonen (Haberer et al., 1993; Jakal et al., 2004).

Eine Schwerionentherapieanlage ist zurzeit in Heidelberg im Bau und wird voraussichtlich Anfang 2008 den Patientenbetrieb aufnehmen. In der Heidelberger Anlage sollen jährlich mehr als 1000 Patienten mit Kohlenstoffionen und Protonen behandelt werden. Da in dieser Anlage auch pädiatrische Patienten behandelt werden sollen, ist es insbesondere nötig, die Risiken und möglichen Spätfolgen einer Schwerionentherapie genau zu untersuchen. Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von dicht- und locker-ionisierender Strahlung auf Zellen des Immunsystems untersucht.

2.8 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, im Rahmen der bei der GSI in Darmstadt durchgeführten Tumorthherapie, die allgemeine Strahlensensitivität humaner Immunzellen zu ermitteln. Untersucht wurde einerseits die Zellvitalität, inflammatorischen Zytokinproduktion, Stickstoffmonoxidproduktion und phagozytische Aktivität humaner und muriner Makrophagen als auch die chromosomale Aberrationsrate in primären B- und T-Lymphozyten.

Makrophagen sind von besonderem Interesse, da sie eine zentrale Rolle im Immunsystem einnehmen. Dabei sind sie sowohl im angeborenen als auch im erworbenen Immunsystem aktiv. Als Auslöser inflammatorischer Reaktionen sind Makrophagen an der Bildung und Progression von strahlentherapeutischen Nebenwirkungen wie Fibrose, Pneumonitis und Mucositis, vor allem durch die Produktion inflammatorischer Zytokine sowie Stickstoffmonoxid beteiligt (Rübe et al., 2005; Schaeue et al., 2005; Liu et al., 2006; Müller & Meineke, 2007). Während einige Untersuchungen zur Wirkung von Röntgenstrahlen auf Makrophagen vorliegen, gibt es bis jetzt keine Studien über die Effekte von dicht ionisierenden Strahlen. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die allgemeine Zellvitalität der Makrophagen nach Bestrahlung, sowie eine mögliche strahleninduzierte Modulation der inflammatorischen Immunantwort untersucht. Der Focus wurde dabei auf die Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β , die Produktion von Stickstoffmonoxid und die phagozytische Aktivität gelegt. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen, eine verlässlichere Risikoabschätzung von Spätfolgen nach therapeutischer Strahlenbehandlung, vor allem inflammatorischer Erkrankungen zu erhalten.

Humane Lymphozyten werden in der Strahlenbiologie häufig als biologisches Dosimeter verwendet, da die Art und Rate der strahleninduzierten Chromosomenaberrationen Rückschlüsse auf die applizierte Dosis bzw. die individuelle Strahlensensitivität erlauben (IAEA, 2001). Humane Lymphozyten sind eine heterogene Gruppe von Immunzellen, die neben T- und B-Lymphozyten auch NK-Zellen und Monozyten enthalten. Bisher wurden in strahlenbiologischen Untersuchungen hauptsächlich T-Lymphozyten untersucht, da diese Zellen den größten Anteil an der Lymphozytenpopulation bilden, und leicht durch spezielle Mitogene wie Phytohämagglutinin stimuliert werden können. Die B-Lymphozyten stellen als Antikörper-produzierende Zellen einen wichtigen Teil der Immunantwort dar. Etwa 10 % der peripheren Lymphozyten sind B-Lymphozyten. Über die allgemeine Strahlensensitivität primärer humaner B-Lymphozyten im Vergleich zu T-Lymphozyten existieren zurzeit nur wenige Informationen. Insbesondere gibt es keine Untersuchungen über die Effekte dicht ionisierender Strahlung. Bei Versuchen mit Hoch-LET-Bestrahlungen konnte gezeigt werden, dass Lymphozyten mit steigender Kultivierungszeit vermehrt Chromosomenaberrationen aufweisen (Lee et al., 2005; Nasonova et al., 2006). Als Grund für die erhöhte Aberrationsrate wurden verstärkte strahleninduzierte Zellzyklus-Verzögerungen diskutiert (George et al., 2001; Ritter et al., 2002; Lee et al., 2005), als auch strahlensensitivere Lymphozyten-Subpopulationen (Hoffmann et al., 2002; Hone et al., 2005). Um zu klären, ob der Unterschied auf dem Vorhandensein von B-

Kapitel 2: Einleitung

Lymphozyten beruht, wurden in der zweiten Teil der vorliegende Arbeit die T- und B-Zellsubpopulationen aus einer Mischung von peripheren mononuklearen Blutzellen getrennt und gereinigt. Anschließend wurde die Anzahl von Chromosomenaberrationen in primären B- und T-Lymphozyten nach Bestrahlung bestimmt und diese Werte miteinander verglichen.

3. Material und Methoden

Die verwendeten Materialien und Geräte wurden, soweit nicht anders aufgeführt, im Anhang Kapitel (Kapitel 6) aufgelistet. Zum Ansetzen von Lösungen und Puffern wurde Reinstwasser aus einer Umkehrosmoseanlage der Firma Millipore GMBH, Eschborn, benutzt und vor Verwendung autoklaviert. Im Weiteren wird dieses Reinstwasser als MilliQ bezeichnet. Das allgemeine Arbeiten mit Zellkulturen erfolgte wie bei Mishell und Shiigi (1980) sowie Lindl und Bauer (1987) beschrieben und wurde gegebenenfalls modifiziert. Die sterilen Arbeiten erfolgten in einer Sterilbank (Hera-safe HSP-12, Kendro-Heraeus, Hanau). Verwendete Materialien wie Pipetten, Zellschaber, Eppendorfreaktionsgefäße, und Plastikspitzen wurden vor Gebrauch bei 121°C und 2 bar Dampfdruck sterilisiert, Glaspipetten wurden bei 160°C für 2 Stunden bei trockener Hitze sterilisiert.

3.1 Verwendete Zellen

3.1.1 Periphere Blutlymphozyten

Lymphozyten sind zelluläre Bestandteile des Blutes und gehören zu den so genannten „weißen Blutkörperchen“ (Leukozyten). Etwa 20% bis 40% der peripheren Leukozyten sind Lymphozyten. Lymphozyten sind eine heterogene Gruppe von Zellen und lassen sich in T-, B-Lymphozyten und NK-Zellen (Natural-Killer-Cells = NK-Zellen) unterteilen. Die Hauptaufgabe der Lymphozyten ist die Erkennung und Beseitigung von Fremdstoffen, sie stellen den wichtigsten Teil des erworbenen Immunsystems dar. Die Lymphozyten werden im Knochenmark aus lymphoiden Vorläuferzellen gebildet und reifen entweder im Knochenmark zu B-Lymphozyten und NK-Zellen bzw. im Thymus zu T-Lymphozyten.

3.1.2 Periphere Monozyten

Periphere humane Monozyten sind die Vorläuferzellen von Gewebemakrophagen und machen 2% bis 10% der Leukozyten aus. Mit ca. 12µm bis 25µm im Durchmesser sind sie die größten Zellen im Blut und stellen einen wichtigen Bestandteil des angeborenen und erworbenen Immunsystems da. Sie werden im weißen Knochenmark aus myelomonocystischen Stammzellen gebildet und nach Differenzierung zu fertigen Monozyten in das Blut abgegeben. Dort zirkulieren sie ca. 2 Tage bevor sie in ein umliegendes Gewebe eindringen und dort zu gewebspezifischen Makrophagen differenzieren. Monozyten sind nach Reifung im Knochenmark nicht mehr teilungsfähig.

3.1.3 Murine Makrophagen Zelllinie RAW 264.7

Die murine RAW 264.7 Makrophagen-Zelllinie (TIB-71, ATCC, Rockville, Maryland, USA) ist eine adhärenz wachsende Zelllinie. Sie stammt aus einem Abelsonmausleukämievirus induzierten Maustumor ab (Raschke et. al, 1978).

3.1.4 Humane Vorhautfibroblasten AG1522D

Die humane Vorhautfibroblasten-Zelllinie Ag1522D wurde vom Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ, USA) bezogen. Sie stammt von einem gesunden, 3 Tage alten, männlichen Spender.

3.2 Isolierung peripherer Blutlymphozyten und Monozyten

3.2.1 Isolierung peripherer Lymphozyten aus Buffy-Coats

Primäre humane Lymphozyten wurden aus so genannten Buffy-Coats gewonnen, die von der Blutspendebank Frankfurt/Main (DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg/Hessen) erworben wurden. Ein Buffy-Coat ist ein antikoaguliertes Leukozytenkonzentrat, welches durch Zentrifugation bzw. Filtration einer Blutspende gewonnen wurde. Die freiwilligen Blutspender waren zwischen 18 und 59 Jahren alt und sowohl männlichen als auch weibliches Geschlechts. Ein Buffy-Coat enthält neben den Leukozyten (Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten) noch Thrombozyten und einige Erythrozyten. Aus dem Buffy-Coat lassen sich mittels Dichtegradienten-Zentrifugation die mononukleären Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells = PBMC) isolieren. Der Inhalt des Buffy-Coat-Beutels wird vor der Verarbeitung 1:1 mit steriler *Phosphat-buffered-Saline*-Lösung (PBS, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen) verdünnt. Jeweils 15 ml einer Ficoll-Hypaque-Lösung (Dichte = 1.077g/ml) werden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gefüllt, vorsichtig mit 30 ml der Buffy-Coat-Zellsuspension überschichtet und für 35 min bei 1600 rpm (ca. 400 x g) bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Die Lymphozyten und Monozyten (PBMC genannt) sammeln sich entsprechend ihrer relativ geringen spezifischen Dichte in der Interphase zwischen Überstand (Plasma/Thrombozyten) und dem Ficoll-Hypaque. Die Granulozyten und Erythrozyten sammeln sich als Zellsediment am Boden des Zentrifugenröhrchens, da sie eine höhere spezifische Dichte haben als das Ficoll-Hypaque. Die Interphaseschicht mit den PBMCs wird mit einer Pipette entnommen und zweimal mit sterilem PBS gewaschen (10 min, 1000 rpm). Zur Entfernung der Monozyten mittels Plastikadhärenz wurden die PBMCs in 250 cm² Flaschen mit einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen pro ml Kulturmedium (siehe Abschnitt 3.4.1) für 2 h im Begasungsbrutschrank inkubiert. Während dieser Zeit adhären die Monozyten am Boden der Kulturflasche. Die nicht adhärenz Zellen (Lymphozyten) wurden nach vorsichtigem Schütteln mit einer Pipette abgezogen, gezählt und für die jeweiligen Experimente weiter verwendet (siehe Abschnitt 3.3).

3.2.2 Isolierung peripherer Lymphozyten aus Frischblut

Die Blutentnahme für die Isolierung aus Frischblut erfolgte durch eine Punktierung der Armvene durch eine qualifizierte medizinisch-technischen Assistentin. Als Blutentnahmesystem wurde das Vacutainer® CPT™ System (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, USA) verwendet. Das Blut wird durch dem im Vacutainer-Röhrchen herrschenden Unterdruck direkt in das Röhrchen gesogen. Die Vacutainer enthalten Heparin-Natrium als Antikoagulant und eine Ficoll-Hypaque/Gel Trennschicht. Direkt nach Entnahme wird das Blut mit dem Koagulant durch mehrmaliges Invertieren des Vacutainers gemischt und anschließend bei 2900 rpm (ca. 1600 x g) für 20 min zentrifugiert. Wie bei der Isolierung von Lymphozyten aus Buffy-Coats sammeln sich auch hier die PBMCs in der Interphase zwischen Ficoll und dem Plasma, Granulozyten und Erythrozyten befinden sich im Sediment am Boden des Vacutainer-Röhrchens. Ein Teil des Plasmas wurde mit einer Pipette bis kurz vor Erreichen der Interphase entfernt und das Röhrchen mit sterilem PBS aufgefüllt (ca. 6 ml PBS). Durch Invertieren wurden die PBMCs mit dem PBS gemischt und anschließend in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1500 rpm (ca. 390 x g) für 10 min ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment mit Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (siehe Abschnitt 3.3).

3.2.3 Isolierung peripherer Monozyten

Humane Blutmonozyten sind in der Lage, an den Boden von Zellkulturgefäßen zu adhären (Edelson et al., 1974). Diese Fähigkeit der Monozyten wird für ihre Isolierung ausgenutzt, indem man frisch gewonnene PBMCs ($\sim 5 \times 10^6$ PBMCs pro ml Kulturmedium, siehe 3.4) für mindestens 2 h in entsprechenden Zellkulturflaschen im Brutschrank kultiviert. In dieser Zeit adhären die Monozyten an den Boden der Zellkulturflasche und die nicht-adhären Lymphozyten können nach vorsichtigem Schütteln abgezogen werden. Nach 2-maligem Spülen der Monozyten mit 37°C warmen PBS wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst, in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (1500 rpm, 10 min). Die Zellen wurden resuspendiert, gezählt und in entsprechenden Zellkulturgefäßen ausgesät. Monozyten die sich nicht erneut an den Boden des Zellkulturgefäßes adhärten, wurden vor Beginn des jeweiligen Experiments durch waschen mit 37°C warmen PBS entfernt.

3.3 Zellzahlbestimmung

3.3.1 Trypanblau-Exklusionsmethode

Die Bestimmung der Lebend-Zellzahl erfolgte durch die Trypanblau-Exklusionsmethode. Der Farbstoff Trypanblau kann intakte Zellmembranen nicht durchdringen, somit werden lebende Zellen nicht angefärbt. Tote Zellen erscheinen dementsprechend im Mikroskop blau und können von lebenden Zellen unterschieden werden. Für die Messung wurde das Zellsediment in 5 ml bzw. 10 ml Medium resuspendiert, ein Aliquot von 50 µl mit einer isotonischen Trypanblaulösung 1:5 bzw. 1:10 verdünnt und die Anzahl ungefärbter Zellen in einer Thoma-Zählkammer bestimmt. Die Thoma-Zählkammer umschließt ein genau definiertes Volumen, so dass die Zellzahl im Sediment berechnet werden kann.

3.3.2 Zellanalysesystem Casy 1

Neben der Trypanblau-Exklusionsmethode wurde das automatische Zellanalysegerät Casy 1 (Schaerfe System GmbH, Reutlingen) für die Zellzahlbestimmung benutzt. Die Zellen wurden hierfür in einer isotonen Elektrolytlösung (CASYton; Schaerfe, Reutlingen) verdünnt und durch eine Kapillare des Zellanalysegeräts gesaugt. Beim Durchtritt durch die Kapillare verändern die Zellen den elektrischen Widerstand innerhalb der Kapillare und ermöglichen es somit dem Gerät Anhand der Anzahl und der Größe der Widerstandsänderung die Anzahl und das Volumen der Zellen zu bestimmen. Für die Bestimmung der Zellzahl humaner Lymphozyten, Monozyten und muriner RAW-Makrophagen wurden 200 µl der Lymphozytensuspension mit 10 ml CASYton verdünnt. Der Messbereich bei Lymphozyten betrug 6 µm-15 µm, für Monozyten und Makrophagen 8 µm-25 µm. Anhand der eingestellten Verdünnung (1:50) errechnet das Gerät nach beendeter Messung die Zellzahl pro Milliliter.

3.3.3 Pappenheim-Färbung von Blutzellen

Die Pappenheim-Färbung ist eine panoptische Morphologie-Färbung die an luftgetrockneten Blutaussstrichen oder Lymphozytenpräparaten vorgenommen wird. Das Blut bzw. die Lymphozytensuspension wird auf einem Objektträger möglichst dünn ausgestrichen und für 24 h luftgetrocknet. Dieser wurde für 5 min mit unverdünnter May-Grünwald-Färbelösung gefärbt, und anschließend für 3 min in destilliertem Wasser gespült. Nachfolgend wird das Präparat für 10 min in 10 % Giemsa-Färbelösung nachgefärbt, mit destilliertem Wasser gewaschen, luftgetrocknet und mit einem Deckglas bedeckt. Die Zellzählung/Auswertung im Mikroskop erfolgt im Hellfeld. Das Zytoplasma ist nach der Färbung hellrosa, der Zellkern dunkel violett angefärbt.

3.4 Zellkultivierung

3.4.1 Zellkulturmedien und Zusätze

Als Basismedium für die Kultivierung humaner Lymphozyten, Monozyten, muriner RAW 264.7 wurde 1640 RPMI-Medium (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) verwendet, für die Kultivierung von AG1522D Fibroblasten EMEM Medium (Cambrex Bio Science, Verviers). Es wurde bei 4°C gelagert, vor Benutzung auf 37°C erwärmt und zu Kulturmedium bzw. Stimulierungsmedium vervollständigt. Dem RPMI-Kultivierungs-Medium für humane Lymphozyten und Monozyten wurde 20% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin und 1% HEPES zugesetzt, dem EMEM-Medium für Fibroblasten 1% Glutamin, 0,5% Penicillin/Streptomycin und 20% FCS. Dem RPMI- Kultivierungsmedium für murine RAW-Makrophagen wurde 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin und 1% HEPES zugesetzt.

Zur Stimulierung der humanen Lymphozyten wurde dem Kultivierungsmedium noch 2,5 µg/ml Pokeweed-Mitogen (PWA; Sigma Chemicals, Deisenhofen) und 15 µg/ml 5-Brom-2-Desoxyuridin (BrdU; Roche, Mannheim) zugesetzt, das Kulturmedium für humane und murine Monozyten/Makrophagen wurde mit 1 µg/ml Lipopolysaccharid (LPS; siehe 3.4.3) zum Stimulierungsmedium vervollständigt.

3.4.2 Kultivierung humaner Lymphozyten

Für die Kultivierung der primären humanen Lymphozyten wurde Stimulierungsmedium verwendet. Die Kultivierung fand in Zellkulturflaschen (75 cm² und 250 cm²) im CO₂ Begasungsbrutschrank (BBD6220; Kendro-Heraeus Instruments, Hanau), bei 37°C, 95% Luftfeuchte und 5% CO₂ statt. Die Zelldichte betrug zwischen 5x10⁵ Zellen/ml und 1x10⁶ Zellen/ml Kulturmedium. Periphere Blutlymphozyten sind normalerweise in der G₀-Phase des Zellzyklus arretiert und müssen durch die Zugabe eines polyklonalen Mitogens aktiviert werden, damit sie in den Zellzyklus eintreten. Für die Aktivierung der Lymphozyten wurde das polyklonale, T-Zell abhängige B-Zell Mitogen Pokeweed-Mitogen (PWA) verwendet. Dem Medium wurde außerdem BrdU beigegeben, das in die DNA der Lymphozyten eingebaut wird und der späteren differentiellen Färbung der Chromosomenpräparate dient. Je nach Versuchsaufbau wurden die Lymphozyten für 48 h bis 96 h im Brutschrank unter Lichtausschluss kultiviert.

3.4.3 Kultivierung und Stimulierung humaner Monozyten

Primäre, periphere Blutmonozyten wurden nach Isolation und Aussaat in die jeweiligen Zellkulturgefäße für 5-7 Tage *in vitro* kultiviert, um sie zu

Makrophagen zu differenzieren. Für die Stimulierung wurde Lipopolysaccharid verwendet. Das LPS wurde aus dem Bakterienstamm *Proteus mirabilis* 19 mit der Phenol/Wassermethode isoliert (Westphal et al, 1952) und nach der Methode vom Gmeiner (1975) aufgereinigt. Verwendet wurde das von Gabi Weber in der Ag Nixdorff/TU-Darmstadt am 23.1.1989 isolierte und gereinigte LPS. Vor Experimentbeginn wurde eine 20-fache-LPS-Stammlösung mit einer Konzentration von 20 µg/ml hergestellt. Nach der Einwaage erfolgte das Lösen des LPS in einem kleinen Volumen 0,04 N Natriumhydroxid (1/4 des Endvolumens) und Homogenisierung in einem Ultraschallbad (10 min). Die Lösung wurde durch Zugabe von Kulturmedium auf das gewünschte Endvolumen eingestellt. Die 20-fache-Stammlösung wurde entsprechend den Versuchsbedingungen auf eine Endkonzentration von 1 µg/ml verdünnt. Die LPS-Inkubationszeit betrug 24 h bzw. 48 h.

3.4.4 Kultivierung und Stimulierung muriner RAW 264.7 Makrophagen

Die RAW 264.7 Makrophagen wurden in einem CO₂ Begasungsbrutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchte und 5% CO₂ kultiviert. Die RAW-Zellen wurden 2-3-mal wöchentlich passagiert. Die Zellen wurden dazu mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Kulturflasche gelöst, in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (1200 rpm, 5 min; Megafuge 1.0, Kendro-Heraeus, Hanau). Nach der Zellzahlbestimmung wurden die Makrophagen mit Kulturmedium auf die gewünschte Zellzahl eingestellt und in entsprechende Zellkulturgefäße überführt. Vor ihrer Verwendung in den jeweiligen Experimenten wurden die RAW-Zellen für mindestens 2 h in dem Begasungsbrutschrank inkubiert werden, um vollständige Adhärenz der Zellen an den Boden der Zellkulturflasche zu gewährleisten. Erst bei vollständiger Adhärenz sind sämtliche physiologischen Immunreaktionen (Zytokinproduktion, NO-Produktion, Phagozytose) vollständig ausgeprägt (Janeway & Travers, 2002). Die RAW Makrophagen wurden *in vitro* mit 1 µg/ml Lipopolysaccharid (LPS) direkt im Anschluss an die jeweiligen Bestrahlungen für 24 h bzw. 48 h stimuliert.

3.5 Trennung von B-Lymphozyten und T-Lymphozyten

Nach Bestrahlung und Stimulierung der Lymphozytensuspension (siehe Kapitel 3.4.2 und 3.8) wurden die T- und B-Lymphozyten voneinander getrennt. Dies geschah mit Hilfe der so genannten „Sheep-Red-Blood-Cell-Rosetting“-Technik (Madsen et.al., 1979). Humane T-Lymphozyten und die meisten NK-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche einen charakteristischen CD2-Rezeptor. (Schmidt et al., 1987; Nagler et al., 1990). Schafserythrozythen (*sheep-red-blood-cells* = SRBCs) exprimieren ein spezifisches T11TS-Molekül auf der Oberfläche, das neben dem natürlichen CD2-Liganden (CD53, LFA-3) ebenfalls von dem CD2-Rezeptor als Ligand erkannt und gebunden werden kann. Nach der Bindung des T11TS-Liganden mit dem CD2-Rezeptor bilden sich so genannte Rosetten aus,

bestehend aus einer T-Zelle und mehreren Schafserythrozyten (siehe Abbildung 3.5).

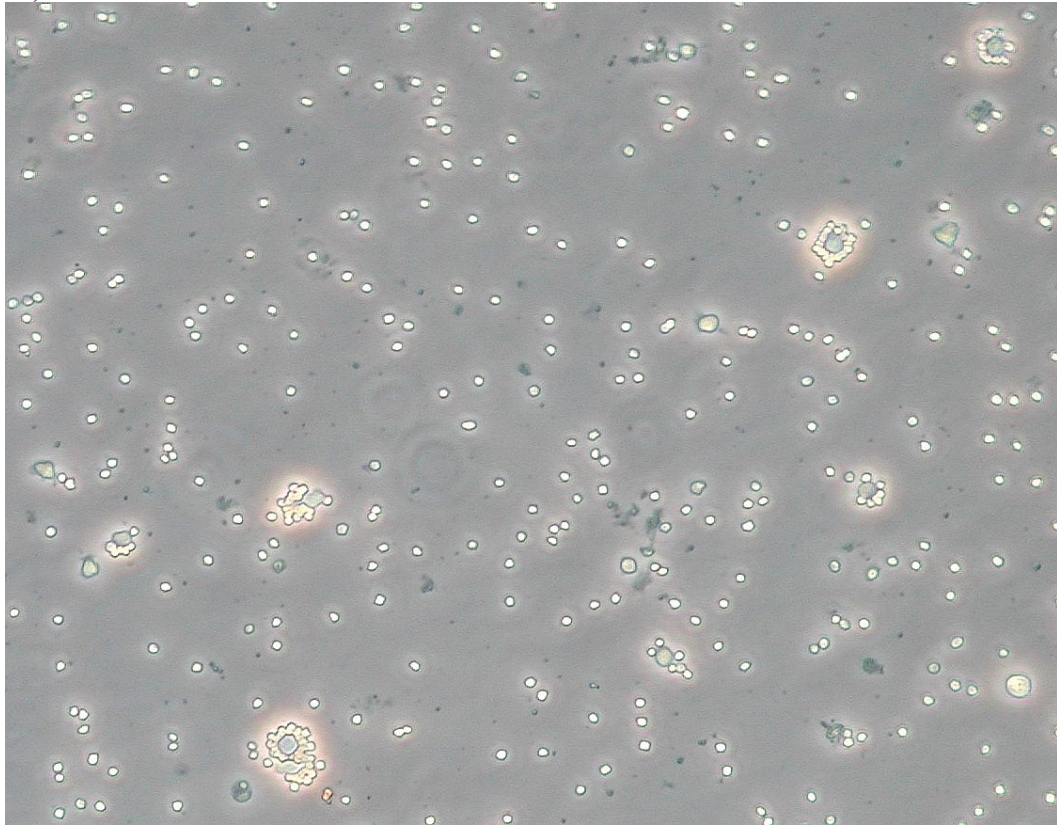


Abbildung 3.5: Phasenkontrastaufnahme einer Lymphozyten-Schafserythrozytensuspension. Vergrößerung = 400x

Diese Rosetten besitzen eine höhere spezifische Dichte als PBMCs und können mit einem Ficoll-Hypaque Dichtezentrifugationsschritt entfernt werden (Boyum, 1964). Da die CD2 negativen Monozyten bereits aus den PBMCs entfernt wurden (siehe Abschnitt 3.2.1) verbleiben lediglich die CD2 negativen B-Lymphocyten in der Interphase zwischen dem Ficoll-Hypaque und dem Überstand.

Jeweils 1×10^8 PBMCs wurden mit 2ml frischen SRBCs (Fiebig Nährstofftechnik, Idstein; aufbewahrt in Alsever-Lösung) in einem 50 ml Zentrifugationsröhrchen vermischt und für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde nicht verworfen, da die Zellen später wieder in diesem resuspendiert werden.

Das Zellsediment wurde für 10 min bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend erfolgte eine vorsichtige Resuspendierung des Zellsediments durch leichtes Kippen und Schütteln des Zentrifugenröhrchens. Zu starkes Schütteln, oder resuspendieren mit Hilfe einer Pipette führt zur Zerstörung der Rosetten. Die Zellsuspension wurde auf Ficoll-Hypaque überschichtet (15 ml Ficoll pro 50 ml Zentrifugenröhrchen) und bei 1600 rpm für 40 min zentrifugiert. Die nicht rosettierten B-Lymphocyten befanden sich in der Interphase und wurden mit Hilfe einer sterilen Pipette entnommen und nach 2-maligem waschen mit sterilem PBS gezählt. Rosettierte T-Lymphocyten wurden mit ACK-Lysepuffer (0,15 M NH_4Cl ; 10 mM KHCO_3 ; 0,1 mM EDTA; pH 7,2) 5 min inkubiert um die Erythrozyten zu lysieren und anschließend zweimal mit sterilem PBS gewaschen und gezählt.

3.6 Isolierung von B-Lymphozyten mit magnetischen Beads

Alternativ zu der verwendeten Schafserythrozyten-Rosettierung wurden B-Lymphozyten durch eine Negativ-Selektion mit Hilfe magnetischer Beads isoliert. Hierfür wurde ein EasySep-B-cell-Kit der Firma StemCell-Technologies™ (Mylan, Frankreich) verwendet. Die Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben. Die frisch isolierte Lymphozytensuspension ($5 \times 10^7/\text{ml}$, maximal 2 ml) wurde mit einer Mischung verschiedener monoklonaler Antikörper (Anti-CD2/ CD3/ CD14/ CD16/ CD36/ CD43/ CD56, Anti-GlycophorinA) inkubiert. Die Antikörper koppeln anschließend an magnetische Beads. Mit Hilfe eines starken Magneten konnten die unerwünschten Zellpopulationen von den B-Lymphozyten getrennt werden.

3.7 Durchflußzytometrische Charakterisierung von Lymphozyten

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie ist es möglich, Zellpopulationen anhand ihrer jeweiligen Größe, Granularität und Fluoreszenzeigenschaften zu untersuchen. Für die Unterscheidung der Lymphozyten-Subpopulationen wurden Antikörper verwendet, welche mit Fluorochromen konjugiert waren. Diese Antikörper waren gegen spezifische Oberflächenantigene der jeweiligen Subpopulation gerichtet. Als Pan-T-Zell-Marker diente das CD3 Oberflächenantigen welches von allen T-Lymphozyten expremiert wird und mit Hilfe eines Anti-CD3-Antikörpers detektiert wurde. B-Lymphozyten wurden mit einem Anti-CD19-Antikörper, ausdifferenzierte Plasmazellen mit einem Anti-CD38 Antikörper detektiert (Tabelle der verwendeten Antikörper siehe Kapitel 7.5). Für die Identifikation von Monozyten wurde ein Anti-CD14-Antikörper verwendet, die Auswertung erfolgte an einem Partec PASIII Flowzytometer (Partec GmbH, Münster). Die Zellsuspension wurde für die Antikörpermarkierung bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellsediment in 200 µl FCS supplementierten PBS resuspendiert (PBS + 1 % FCS). Nach Zugabe von jeweils 10 µl Antikörperlösung wurden die Zellen für 30 min bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend erfolgte zweimaliges waschen mit PBS+FCS und Resuspendierung in 1ml PBS. Die Zellen wurden direkt nach der Färbung und dem waschen mit 1% PFA fixiert. Die Zellkernfärbung erfolgte durch Zugabe von 1 µg Höchst 33258 (Sigma Chemie, Deisenhofen). Die Fluoreszenzsignale der Antikörper werden mit dem Programm Flowmax (Partec GmbH, Münster) ausgewertet in einen so genannten Dotplot gegeneinander aufgetragen (Abbildung 3.7) und darin der Anteil der jeweiligen markierten Population erfasst. Es wurden mindestens 10.000 Zellen ausgewertet. Die unmarkierten Kontrollzellen werden in das Feld Q3 dargestellt. Hierfür wird der Verstärkungsfaktor der Fluoreszenzkanäle so eingestellt, dass der relative Fluoreszenzwert der Kontrollzellen zwischen 1 und 3 liegt.

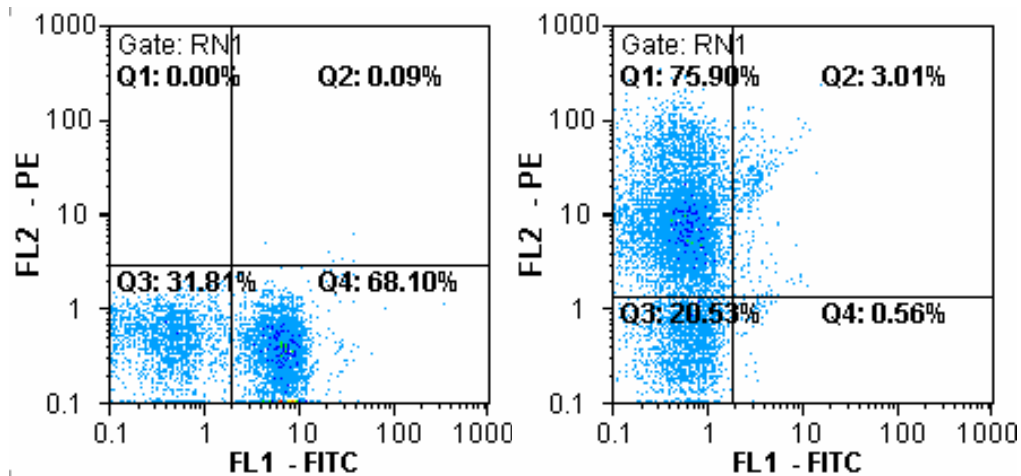


Abbildung 3.7: Dotplot-Darstellung von zwei Lymphozytenkulturen. Im linken Dotplot sind CD3-FITC markierte T-Zellen im rechten Quadranten (Q4) zu sehen, mit einem Anteil von 68,1% an der Gesamtpopulation. Im rechten Dotplot sind CD19-PE markierte B-Lymphocyten nach Isolierung mit Schafserythrozyten dargestellt (Quadrant Q1). Die PE-positiven Zellen sind im linken oberen Quadranten zu erkennen, mit einem Anteil von 75,9% an der Gesamtpopulation. Der Anteil an unmarkierten Zellen in den jeweiligen Populationen liegt in Quadrant Q3

3.8 Bestrahlung der Zellen

3.8.1 Hochenergetischen Kohlenstoffionen

Die Bestrahlung der Lymphozytenkulturen mit hochenergetischen Kohlenstoffionen erfolgte am Schwerionensynchrotron (SIS) der GSI in Darmstadt. Die Energie der Ionen beim Auftreffen auf das Target betrug 90 MeV/u (LET = 29 keV/ μ m). Die Bestrahlung wurde bei Raumtemperatur in einer rechteckigen Polyethylen-Bestrahlungskammer durchgeführt. Die Lymphozyten-Zellsuspension wurde 20 min vor der Bestrahlung mit einer Zelldichte von etwa 7×10^6 Zellen pro ml in die Bestrahlungskammer überführt. Der Teilchenstrahl wurde mit Hilfe des Raster-Scanners (Haberer et al., 1993) über die Probe geführt, um eine gleichmäßige Bestrahlung zu gewährleisten. Die Dosimetrie wurde mit Hilfe kalibrierter Ionisationskammern durchgeführt (Heeg et al., 1999). Nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit einer sterilen Kanüle entnommen und wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben kultiviert und stimuliert.

3.8.2 Niederenergetische Kohlenstoffionen

Die Bestrahlung von humanen Makrophagen und murinen RAW-Makrophagen mit niederenergetischen Kohlenstoffionen erfolgte am Linearbeschleuniger UNILAC der GSI in Darmstadt. Die Primärenergie der Kohlenstoffionen betrug 11,4 MeV/u

(9,8 MeV/u auf dem Target). Der Durchmesser einer Teilchenspur errechnet sich mit folgender Formel (Scholz, 2003):

$$R_{\max} = 0,05 \times E^{1,7}$$

R = Radius des Spurdurchmessers [μm]

E = Spezifische Energie des Ions in MeV/u

Die Zellen wurden mindestens 24 h vor der Bestrahlung in 3,5 cm Petrischalen ausgesät (Makrophagen = 1×10^6 Zellen pro ml; RAW-Makrophagen = 5×10^5 Zellen pro ml), um eine vollständige Adhärenz zu gewährleisten. Die Petrischalen wurden senkrecht in ein mit Grundmedium gefülltes Plexiglas-Magazin gestellt und das Magazin fest verschlossen. Die Magazine wurden erst wieder in der Biologischen Bestrahlungsanlage (BiBA) am Experimentierplatz X6 geöffnet. Die Petrischalen wurden zur Bestrahlung mit Hilfe eines pneumatischen Saugers in den Strahlengang gehoben. Die Dosimetrie erfolgte durch eine am Austrittsfenster angebrachte geeichte Ionisationskammer. Nach Bestrahlung mit 0-32 Gy (Fluenzen 0 – $1,2 \times 10^8/\text{cm}^2$) wurde die Position der Petrischalen in dem Magazin markiert, das Magazin fest verschlossen und zurück in das Labor gebracht. Am unteren Rand der Petrischale sammelt sich während der Bestrahlung ein Flüssigkeitstropfen, der die darunter liegenden Zellen vor der Kohlenstoffionenstrahlung abschattet, da die niederenergetischen Kohlenstoffionen nur eine Eindringtiefe von wenigen hundert Mikrometern besitzen. Anhand der Position der angebrachten Markierung am oberen Rand der Petrischale konnten die abgeschatteten und somit unbestrahlten Zellen anschließend mit einem sterilen Wattestäbchen entfernt werden. Die Zeit von Ende der Inkubation über die Bestrahlung bis zur Aufarbeitung betrug zwischen 30 min und 1 h.

3.8.3 250 kV Röntgenstrahlen

Als Referenzstrahlung wurde 250 kV Röntgenstrahlung verwendet. Die Bestrahlung erfolgte in einer Bestrahlungseinrichtung der Firma Seifert (Seifert, Bridge Port, USA), bei einer Beschleunigerspannung von 250 kV und 16 mA Stromstärke. Für die Absorption der weichen Strahlenteile wurde ein Aluminium- und ein Kupferfilter der Stärke 1 mm verwendet. Die maximale Dosisleistung, abhängig vom Abstand der Probe zum Austrittsfenster, betrug 6 Gy/min, die Dosisleistung wurde mit Hilfe eines Stabdosisimeters (DL4; Pyschlau) bestimmt. Die Zeit vom Ende der Inkubation über die Bestrahlung bis zur Aufarbeitung bzw. Rekultivierung betrug 15 min-20 min.

3.9 Herstellung von Chromosomenpräparaten

Zur Anreicherung von Mitosen wurde der stimulierten Lymphozyten-Zellsuspension 3 h vor Beginn der Chromosomenpräparation Colcemid zugegeben (200 ng/ml). Die Zellsuspension wurde anschließend in 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt, bei 1000 rpm ($170 \times g$) 6 min zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Das Zellsediment wurde in dem vorhandenen Restvolumen resuspendiert. Das Quellen der Zellen erfolgte durch tropfenweise Zugabe von 0,075 M KCl-Lösung (37°C) unter ständigem Schütteln um ein Verklumpen zu vermeiden. Nachdem das Röhrchen zur Hälfte gefüllt war, wurde es zügig aufgefüllt. Die Zellen wurden für 10 min in der KCl Lösung belassen, für 8 min bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde wieder im Restvolumen resuspendiert und anschließend mit einer frisch angesetzten Lösung aus drei Teilen Methanol und einem Teil Eisessig (im weiteren Fixativ genannt) fixiert. Die Zugabe erfolgte wieder tropfenweise unter ständigem schütteln, um ein Verklumpen zu vermeiden. Die Zellen wurden für 10 min bei 1200 rpm (ca. 250 x g) zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Sediment anschließend wieder resuspendiert, mit frischem Fixativ gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen verblieben im zweiten Fixativ für mindestens 10 min um eine vollständige Fixierung zu gewährleisten.

Vor dem tropfen der Zellsuspension auf Objektträger wurde erneut zentrifugiert, das Fixativ bis auf eine geringe Restmenge entfernt und die Zellsuspension im Restvolumen resuspendiert. Der Objektträger wurde mit MilliQ befeuchtet, sodass sich ein dünner, gleichmäßiger Wasserfilm auf ihnen bildete. Anschließend wurden 20 µl der Zellsuspension auf den befeuchteten Objektträger aufgebracht. Das verdrängte Wasser wurde sofort mit einem sauberen Papiertuch entfernt, um eine gute Spreizung der Chromosomen zu erzielen. Unmittelbar nach dem Trocknen wurde die Qualität der Präparate am Mikroskop im Phasenkontrastlicht überprüft. Die Präparate wurden über Nacht bei Raumtemperatur gelagert und anschließend gefärbt. Überschüssige Zellsuspension wurde bei -20°C gelagert, nachdem das Röhrchen mit frischem Fixativ aufgefüllt wurde.

3.10 Fluoreszenz plus Giemsa-Färbung (FGP-Färbung) der Chromosomenpräparate

Die FPG-Färbung ist eine differentielle Färbetechnik, die es möglich macht, Zellen in der ersten, zweiten oder höheren Mitose nach Bestrahlung voneinander zu unterscheiden (Perry & Wolff, 1974). Da die DNA-Synthese semikonservativ verläuft, wird das Thymidin-Analogon BrdU während der Replikation nur in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut. Bei der ersten Replikation ist somit das BrdU unifilar (einsträngig) in die DNA eines Chromatids eingebaut. Bei der zweiten Replikation wird das BrdU bifilar (zweisträngig) eingebaut, wobei das Schwester-Chromatid nur unifilar substituiert ist, denn es enthält noch den Matrizenstrang, in den kein BrdU eingebaut wurde. Durch die unterschiedliche Substituierung der DNA-Stränge wird nach UV-Bestrahlung und waschen der Zellen eine unterschiedliche Anfärbbarkeit der Chromatiden mit Giemsa-Färbelösung erreicht. Chromosomen von Zellen in der ersten Mitose nach Zugabe von BrdU erscheinen komplett dunkel. Bei Metaphase-Chromosomen des zweiten Zellzyklus nach BrdU Zugabe erscheinen eine Chromatide hell und eine dunkel gefärbt. Kommt es zu Chromatidaustauschen zwischen den Schwesterchromatiden, ist dies an den typischen „Harlekin-Mustern“ zu erkennen. Metaphasen der dritten

oder höheren Mitose zeigen einen geringeren Anteil an dunkel gefärbten Chromatiden (Abbildung 3.10).

Die Chromosomenpräparate wurden für die Färbung eine Stunde mit einer Bisbenzimid-Lösung (Höchst 33258; 5 µg/ml in MilliQ) unter Lichtausschluss inkubiert, anschließend zweimal mit MilliQ gewaschen und luftgetrocknet. Die Präparate wurden nach vollständiger Trocknung mit Bestrahlungspuffer (19,45 ml 0,2 M Na₂HPO₄ + 0,55 ml 0,1 M Zitronensäure) überschichtet, mit einem Deckglas abgedeckt und mit Hilfe einer UV-Lampe mit kurzwelligem UV-Licht der Wellenlänge 360 nm 1 Stunde lang bestrahlt. Es folgte ein zweimaliges waschen mit MilliQ und Lufttrocknung, bevor die Präparate für 30 min in einer 2x SSC (pH 7,2) bei 55°C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Präparate mit einer 6%igen Giemsa-Lösung in Sörensenpuffer (0,067 M Dinatriumhydrogenphosphat + 0,067 M Kaliumdihydrogenphosphat; pH 7,2) für 10 min gefärbt, 2-mal in MilliQ gewaschen und luftgetrocknet. Nach vollständiger Trocknung über Nacht wurden die Präparate mit einem Deckglas und 3 Tropfen Eukitt (O.Kindler, Freiburg) eingedeckt.

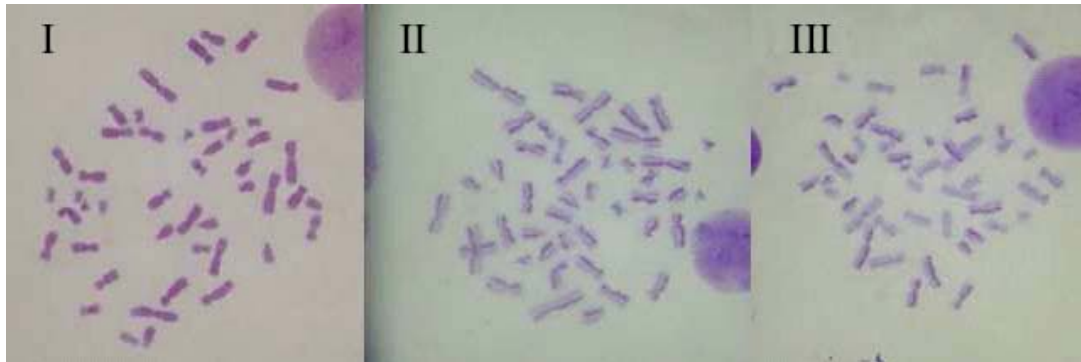


Abbildung 3.10: Mitotische Zellen in der ersten (I), zweiten (II) und dritten Methaphase nach BrdU-Inkorporation und FPG-Färbung. Die Chromatiden von Metaphasen in der 1. Mitose sind alle dunkel gefärbt. In der 2. Mitose sind nur noch 50% der Chromatiden dunkel gefärbt, Zellen in der 3. Mitose haben weniger als 50% dunkel gefärbte Chromatiden. (Foto von Ryonfa Lee, 2006)

3.11 Auswertung der Chromosomenpräparate

3.11.1 Bestimmung des Mitoseindex, Stimulierungsindex und Zellzyklusverteilung

Für die Bestimmung des Mitoseindex wurden mindesten 2000 Zellkerne in den FPG-gefärbten Präparaten gezählt und darin der Anteil an Mitosen bestimmt. Stimulierte Zellen wurden anhand ihrer charakteristischen Kernmorphologie und der unterschiedlichen Anfärbbarkeit nach BrdU-Inkorporation erfasst. Unstimulierte Zellen besitzen einen kleinen, dichten, stark dunkel gefärbten Zellkern, stimulierte Zellen besitzen einen größeren, nicht so stark kondensierten Zellkern, der deutlich heller gefärbt ist. Die Bestimmung der Zellzyklusverteilung erfolgte durch Zählung

von Metaphasen in der 1., 2. und 3. Mitose nach Bestrahlung und Stimulierung. Mindestens 300 Metaphasen wurden hierfür ausgewertet. Die Auswertung erfolgte durch Elena Nasonova, GSI Darmstadt.

3.11.2 Bestimmung der Schwesterchromatid-Austausche (SCEs)

Die Bestimmung der Schwesterchromatid-Austausche (Sister-Chromatid-Exchanges; SCE) erfolgte in Metaphasen der zweiten Mitose nach Bestrahlung und Stimulierung der Zellen. Als SCE werden nicht die ausgetauschten Bereiche gewertet, sondern die Bruchereignisse, die zur Bildung dieser Austausche geführt haben. Somit wird jeder Hell-Dunkel-Wechsel als SCE gezählt. Nicht terminal liegende Austausche werden als zwei SCEs gewertet. Austausche im Zentromerbereich der Chromosomen werden nicht als SCE gezählt, da ein solcher Austausch durch eine Verdrehung der Chromatiden am Zentromer zustande gekommen sein könnte. Ebenso wird ein Hell-Dunkel-Wechsel auf einer Chromatide nicht als SCE gezählt, wenn kein analoger Wechsel an der gleichen Stelle des Schwesterchromatids erkennbar ist. In diesem Fall wird der Hell-Dunkel-Wechsel fehlerhafter Färbung zugeschrieben. Für die Ermittlung der SCE-Rate wurden mindestens 50 vollständige Metaphasen pro Probe ausgewertet, die Auswertung erfolgte an einem Mikroskop der Firma Leica (Typ DMRB) bei 1000-facher Vergrößerung.

3.11.3 Bestimmung der Chromosomenschäden

Die FPG-gefärbten Chromosomenpräparate wurden mit einem Leica Mikroskop (Typ DMRB) bei 600-1000facher Vergrößerung analysiert. Pro Dosis und Zeitpunkt wurden jeweils 100 erste Mitosen ausgewertet, soweit dies möglich war. Die Auswertung und Klassifikation der Chromosomenaberrationen erfolgte wie bei Savage (1976) beschrieben. Eine Übersicht der in den Metaphasen sichtbaren Aberrationen ist in Abbildung 3.11.3 zu sehen. Die Abkürzungen der Aberrationen entsprechen der ISCN (*international system for human cytogenetic nomenclature*). In den FPG-gefärbten Präparaten lassen sich sowohl Chromatid-Typ-Aberrationen als auch Chromosomen-Typ-Aberrationen erfassen (siehe Abbildung 3.11.3). Die für die Experimente benutzten Lymphozyten befanden sich während der Bestrahlung in der G₀-Phase. Daher führen induzierte Doppelstrangbrüche zu Chromosomen-Typ-Aberrationen. Chromosomenfragmente (csb) entstehen durch nicht reparierte Doppelstrangbrüche in der G₀/G₁-Phase. Interstitielle Deletionen und azentrische Ringe werden als dmin („double minute“) zusammengefasst. Zentrische Ringe entstehen durch Doppelstrangbrüche auf beiden Armen der Chromatiden und sind in der Regel von einem Fragment begleitet. Ein zentrischer Ring und ein acentrisches Fragment werden zusammen als eine Aberration gewertet. Dizentrische Chromosomen (dic) entstehen durch Doppelstrangbrüche in zwei unterschiedlichen Chromosomen. Während der DNA-Reparatur werden die beiden zentrischen Fragmente zu einem dizentrischen Chromosom und die azentrischen Bruchstücke zu einem Chromosomenfragment verknüpft. Ein

dizentrisches Chromosom und ein Chromosomenfragment werden zusammen als eine Aberration gewertet. Trizentrische Chromosomen mit zwei azentrischen Fragmenten werden als zwei dizentrische gewertet, entsprechend werden polyzentrische Chromosomen mit den dazu gehörenden azentrischen Fragmenten in dizentrische umgerechnet und gewertet. Bei fehlerhafter Reparatur von Einzelstrangbrüchen und Basenschäden die in der G₁/G₀-Phase auftreten, können diese im Verlauf des Zellzyklus zu Chromatidbrüchen (ctb) oder Chromatidaustauschaberrationen (cte) auftauchen.

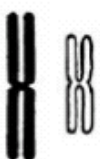






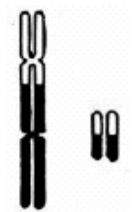
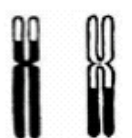
Normal	Chromatid break (ctb)	Chromosome fragment (csb)	Acentric ring (dmin)	Centric ring with fragment (r)	Translocation (t)
					
Chromatid exchange (cte)		Dicentric with fragment (dic)		Reciprocal exchange (not observable)	
					

Abbildung 3.11.3: Schematische Darstellung von Aberrationen in Anlehnung an Evans et al. (1975) mit den dazu gehörenden Abkürzungen (ISCN, 1978). Reziproke Austausche sind mit der FGP-Färbung nicht darstellbar, ebenso sind Translokationen nur in sehr seltenen Fällen sichtbar, wenn das Chromosom eine deutliche atypische Struktur aufweist. Aus diesem Grund wurden diese beiden Aberrationstypen nicht ausgewertet.

3.12 Nachweis der Produktion inflammatorischer Zytokine mittels enzymgebundenen Immunoassay (ELISA)

Der Nachweis der von Monozyten und Makrophagen gebildeten proinflammatorischen Zytokinen in Zellkulturüberständen und Zelllysaten erfolgte mit Hilfe eines enzymgebundenen Immunassys (Enzyme-Linked-Immunosorbant-Assay ELISA). Zur Anwendung kann die so genannte *Sandwich*-Methode. Hierfür wird ein spezifischer Antikörper (*Coating*-Antikörper) an den Boden einer Mikrotiterplatte gebunden und mit einer Antigenlösung unbekannten Gehalts

inkubiert. Der spezifische Antikörper bindet das entsprechende Antigen in dieser Lösung. Nach dem Waschen wird das gebundene Antigen mit einem zweiten, Biotin- bzw. Streptavidin-markierten Detektions-Antikörper inkubiert, der das Antigen an einem anderen spezifischen Epitop als der *Coating*-Antikörper erkennt und bindet. Überschüssiger Detektions-Antikörper wird durch Waschen entfernt und eine Avidin-markierte Peroxidase zugegeben. Das Avidin bindet an das Biotin bzw. Streptavidin des Detektions-Antikörpers. Nach Zugabe einer farblosen Substratlösung spaltet die Peroxidase das Substrat in ein farbiges Produkt, das photometrisch detektiert werden kann. Über einen mitgeführten Antigen-Standard kann die Konzentration der zu untersuchenden Antigen-Lösung bestimmt werden. Der Nachweis der Zytokinproduktion erfolgte 24 h bzw. 48 h nach Bestrahlung (0 Gy bis 32 Gy 250 kV Röntgenstrahlung bzw. 0 Gy bis 32 Gy 9,8 MeV/u C-Ionen) der Monozyten/Makrophagen. Für Bestrahlungsexperimente wurden 1×10^6 Zellen verwendet. Je nach Experimentaufbau wurden die Zellen direkt im Anschluss an die Bestrahlung zusätzlich mit 1 µg/ml LPS stimuliert.

3.12.1 Bestimmung des proinflammatorischen Zytokins Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) in humanen Monozyten und muriner RAW 264.7 Makrophagen

Der Nachweis von human bzw. murinen TNF- α erfolgte in den Zellkulturüberständen bestrahlter humaner Monozyten bzw. muriner RAW 264.7 Makrophagen. Es wurde ein ELISA-Kit der Firma R&D Systems GmbH, Heidelberg, benutzt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration der Antikörper und der Avidinperoxidase entsprachen dem mitgelieferten Protokoll. Die Absorptionsmessungen wurden in einem ELISA-Reader (BioTek EL808; BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall) bei einer Messwellenlänge von 450 nm und der Referenzwellenlänge von 690 nm durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Excel®.

3.12.2 Bestimmung des proinflammatorischen Zytokins Interleukin- β (IL-1 β) in humanen Monozyten und murinen RAW 264.7 Makrophagen

Die Bestimmung von IL-1 β erfolgte in Zelllysaten bestrahlter RAW 264.7 Makrophagen bzw. humaner Makrophagen. Im Gegensatz zu Monozyten behalten differenzierte Makrophagen mehr IL-1 β im Zellinnern als sie in den Zellüberstand sezernieren (Wewers & Herzyk, 1989; Dissertation Dagmar Schilling, 2000). Die Zelllyse erfolgte durch Zugabe von 1 ml Triton-X-100-Lösung (0,1% Triton-X-100 in MilliQ) pro 3 cm Petrischale und 20 min Inkubation auf dem Schüttler. Ebenso wie der Nachweis von TNF- α erfolgte die Bestimmung des IL-1 β -Gehalts mit Hilfe eines ELISA-Kits der Firma R&D Systems, Heidelberg, nach Angaben des Herstellers. Die Absorption wurde bei einer Messwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm durchgeführt.

3.13 Nachweis der Produktion von Stickstoffmonoxid in murinen RAW 264.7 Makrophagen

Das durch aktivierte Makrophagen gebildete Stickstoffmonoxid (NO) reagiert mit Sauerstoff zu Nitrit (Pollock, 1991). Die Konzentration des produzierten NO wird somit indirekt über die Nitritkonzentration im Zellkulturüberstand mit einem modifizierten Griess-Reagenz kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt (Grisham et al., 1996).

RAW 264.7 Makrophagen (1×10^6 Zellen) wurden je nach Experiment mit niederenergetischen Kohlenstoffionen (9,8 MeV/u; LET = 170 keV/ μ m) bzw. 250 kV Röntgenstrahlung bestrahlt (0,25 Gy – 32 Gy) und direkt nach Bestrahlung mit 1 μ g/ml LPS stimuliert. Nach 24 h bzw. 48 h erfolgte der Nachweis von Nitrit im Zellkulturüberstand (Grisham et al., 1996)

3.14 Messung der Zellvitalität / metabolischer Aktivität humaner und muriner Makrophagen mittels MTT-Test

Mit Hilfe des MTT-Tests ist es möglich, die Zellvitalität bzw. die metabolische Aktivität anhand der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenasen zu messen. Das gelbe, wasserlösliche 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) wird von lebenden Zellen aufgenommen und von den mitochondrialen Dehydrogenasen zu violetter, wasserunlöslichen Formazan reduziert. Da die Aktivitäten der Dehydrogenasen direkt vom physiologischen Status der Zelle abhängig sind, lässt sich eine Aussage über Ihre Vitalität treffen.

Murine Makrophagen (1×10^6 Zellen in 3 cm Petrischalen) wurden mit niederenergetischen Kohlenstoffionen (9,8 MeV/u; LET = 170 keV/ μ m) oder 250 kV Röntgenstrahlung bestrahlt (jeweils 0 Gy – 32 Gy) und mit 1 μ g LPS stimuliert. Der MTT-Test wurde 24 h bzw. 48 h nach Bestrahlung durchgeführt. Das Medium, welches 5 mg/ml MTT enthielt, wurde hierfür abgesaugt und durch frisches, supplementiertes RPMI-Medium ersetzt. Nach 45 min wurde die Reaktion beendet indem das MTT- haltige Medium abgesaugt wurde.

Das Lösen der gebildeten wasserunlöslichen Formazankristalle erfolgte durch Zugabe von jeweils 1 ml sauren Isopropanols (0,04 N HCl in Isopropanol). Die optische Dichte der Formazanlösung wurde in einem Absorptionsreader bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Die Referenzwellenlänge betrug 690 nm.

3.15 Messung der Phagozytoserate humaner Monozyten und muriner RAW 264.7 Makrophagen

Die Bestimmung der Phagozytoserate humaner und muriner Makrophagen erfolgte durch die Auszählung internalisierter Latex-Kügelchen der Größe 1,1 μ m. Die so genannten Latex-Beads können von Makrophagen als fremd erkannt und als folge dessen phagozytiert werden. Die Latex-Beads bleiben in den Makrophagen erhalten und können mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops sichtbar gemacht werden. Es

wurde der Anteil an phagozytierenden Zellen und die mittlere Anzahl an Beads pro Zelle ausgewertet. Das Verhältnis von Latex-Beads zu Zellen betrug 100:1. Die benötigte Menge an Latexsuspension wurde mit folgender Formel berechnet:

$$N = \frac{1,828 * 10^{11}}{d^3}$$

N entspricht der Anzahl an Latex-Beads pro ml und d dem Durchmesser der Latexpartikel in μm . Die Latex-Beads wurden entsprechend der benötigten Menge in supplementiertem RPMI Medium verdünnt. Das Medium der zu zählenden Zellen wurde entfernt und das mit Latex-Beads angereicherte RPMI Medium auf die Zellen gegeben. Nach einer Stunde wurde das Medium abgezogen und die Zellen jeweils fünfmal in PBS gewaschen, um nicht phagozytierte, bzw. nicht adhärierte Beads zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 2,5% Glutaraldehyd für eine Stunde fixiert und danach zweimal mit PBS gewaschen. Die Auswertung der Präparate erfolgte an einem Leica DMIL Mikroskop im Phasenkontrastlicht. Es wurden mindestens 500 Zellen für die Bestimmung der Phagozytoserate ausgewertet (Abbildung 3.15).

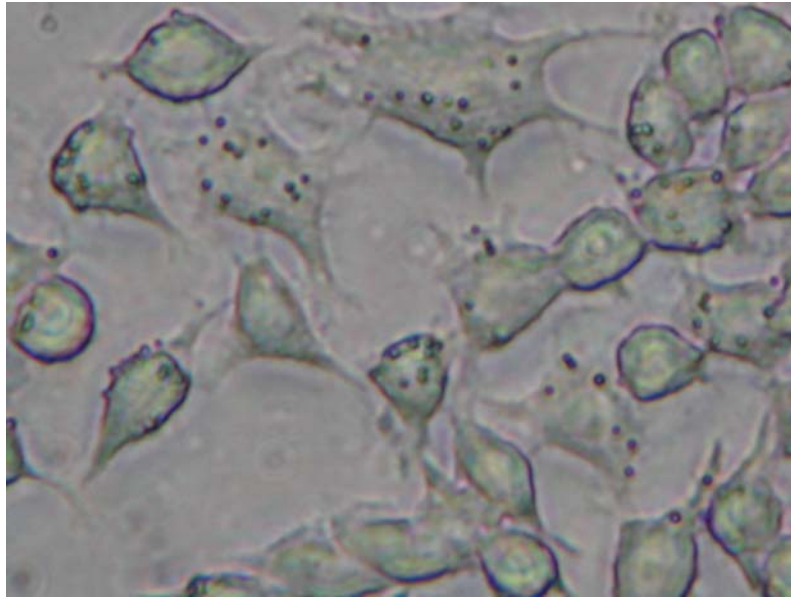


Abbildung 3.15: RAW 264.7 Makrophagen mit internalisierten Latex-Beads. Die Inkubationszeit der Latex-Beads mit den Zellen betrug 1 h. Die Beads sind als dunkle Punkte in und an den Zellen zu erkennen.

3.16 Bestimmung der Zellkernflächen humaner Lymphozyten und muriner RAW 264.7 Makrophagen

Für die Berechnung der Trefferwahrscheinlichkeit von Ionenstrahlen in den Zellkern von Zielzellen ist neben der Angabe der Energie und der Fluenz der Ionen auch die individuelle Fläche des Zellkerns von Bedeutung. Für die Messung der Zellkerngröße von murinen RAW 264.7 Makrophagen wurden 1×10^6 Zellen in eine 3 cm Petrischale ausgesät, über Nacht kultiviert und anschließend mit 2,5% Glutaraldehyd fixiert. Die DNA wurde mit einer DAPI-Färbelösung (1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI

in PBS) für 30 min gefärbt, anschließend zweimal mit PBS gewaschen und mit Hilfe eines Leica DIM-IRE2 Fluoreszenzmikroskops Bilder der unter UV-Licht fluoreszierenden Zellkerne aufgenommen (Abbildung 3.16).

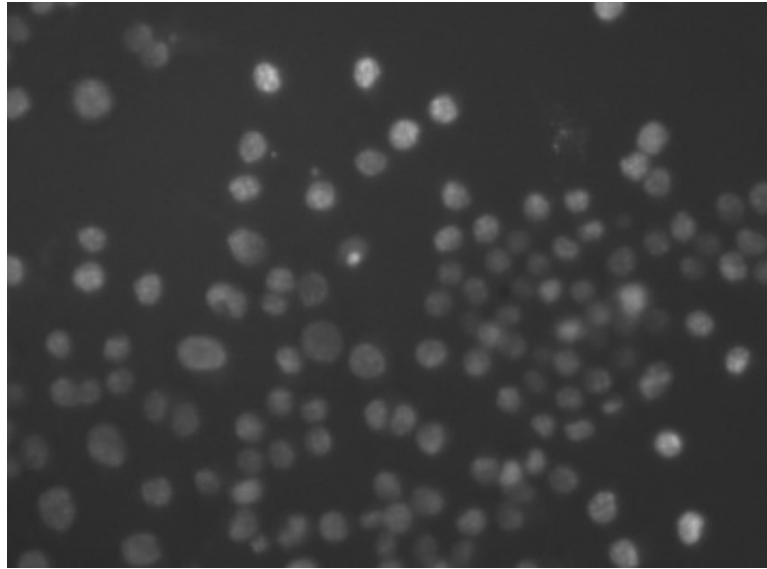


Abbildung 3.16: DAPI gefärbte Zellkerne einer RAW 274.7 Kultur. Die hellen Zellkerne heben sich deutlich vor dem Hintergrund ab. Das Zytoplasma wurde nicht mit angefärbt.

Mit Hilfe des Programms ImageJ wurde eine Konvolutions-basierte Maskenerstellung durchgeführt, die die Umrisse der Zellkerne erkennt und anhand eines vorher festgelegten Größenstandards die Zellkernfläche bestimmt (Winter, 2007). Es wurden etwa 4100 Zellkerne durch das Programm analysiert und anschließend die statistische Verteilung der Zellkernfläche errechnet.

Für die Bestimmung der Zellkernfläche von primären humanen Lymphozyten wurden frisch isolierte Lymphozyten eines gesunden Spenders entnommen, diese anschließend mit 2,5 % Glutaraldehyd fixiert und 20 min mit einer DAPI-Färbelösung gefärbt. Anschließend wurde die fixierte und gefärbte Zellsuspension bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment in ca. 200µl PBS resuspendiert, auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Aufnahmen erfolgten wieder mit dem Leica-Fluoreszenzmikroskop, die Berechnung der Zellkerngröße wurde mit dem Programm ImageJ durchgeführt.

3.17 Apoptosemessung

In der Zellbiologie unterscheidet man verschiedene Formen des Zelltods. Die beiden häufigsten Arten des Zelltods ist der programmierte Zelltod, Apoptose genannt, und die Nekrose. Apoptose ist ein gezielt gesteuerter physiologischer Prozess, der die Homöostase eines Organismus aufrechterhält. Die Apoptose äußert sich durch Veränderungen in der Zellmembran, Chromatin-Kondensation, DNA-Fragmentierung und letztlich dem Zerfall der Zelle. Die morphologischen Veränderungen des Zellkerns (Kondensation und Ausbildung so genannter *apoptotic*

bodies) erlauben eine Diskriminierung apoptotischer Zellen von gesunden Zellen. Die Zellen wurden hierfür mit 4 % Paraformaldehyd fixiert, anschließend mit 10 µg/ml Acridin-Orange und 1 µg/ml Hoechst 33342 gefärbt und die Kernmorphologie mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet (Abbildung 3.17). Für die Bestimmung der Apoptoserate wurden mindestens 500 Zellen ausgewertet.



Abbildung 3.17: Humane Lymphozyten nach Färbung mit AcridineOrange und Hoechst 33342. Die linke Zelle zeigt eine normale Kernmorphologie, die Zelle rechts ist eine apoptotische Zelle mit typischem fragmentiertem Kern. (Abbildung = Lee, 2006)

4. Ergebnisse

4.1 Vorversuche

4.1.1 Bestimmung der Zellkernflächen und Trefferzahl in murinen Makrophagen

Makrophagen stellen einen wichtigen Teil des Immunsystems dar. Sie sind in der Lage, inflammatorische Zytokine zu produzieren und phagozytieren körperfremde Partikel wie Bakterien, Viren, Pilze sowie körpereigene, abgestorbene Zellen. Nach therapeutischer Strahlenbehandlung kommt es häufig zu inflammatorischen Nebeneffekten wie Fibrose, bei der Gewebemakrophagen involviert sind (siehe Kapitel 2.5). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob ionisierende Strahlung in der Lage ist, eine inflammatorische Reaktion in Makrophagen zu produzieren, sowie diese Reaktionen zu modulieren. Hierfür wurde 250 kV Röntgenstrahlung und 9,8 MeV/u Kohlenstoffstrahlung verwendet. Da es sich bei der Kohlenstoffbestrahlung um Teilchenstrahlung handelt ist es nötig, die Größe des Zellkerns der Zielzellen zu kennen, um Aussagen über die Anzahl von Kerntreffern zu erhalten.

Bei der Bestrahlung mit 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen ($LET=170 \text{ keV}/\mu\text{m}$) beträgt der Radius einer Teilchenspur $2,4 \mu\text{m}$ ($\sim 18 \mu\text{m}^2$ Teilchenspurfläche)(siehe Kapitel 3.8.2). Für die Bestimmung der Trefferwahrscheinlichkeit bei vorgegebener Dosis wird die Fläche der Zellkerne bzw. der Radius des Zellkerns benötigt. Die Zellkernfläche wird nach DAPI-Färbung der Zellen mit Hilfe eines Konvolutionsbasierten Bilderkennungsalgorithmus bestimmt (siehe Abschnitt 3.16; Winter, 2007). Die Verteilung der Zellkernflächen von murinen RAW 264.7 Makrophagen ist in Abbildung 4.1.1 dargestellt. Die Intervallbreite der dargestellten Histogrammdaten betrug $10 \mu\text{m}^2$

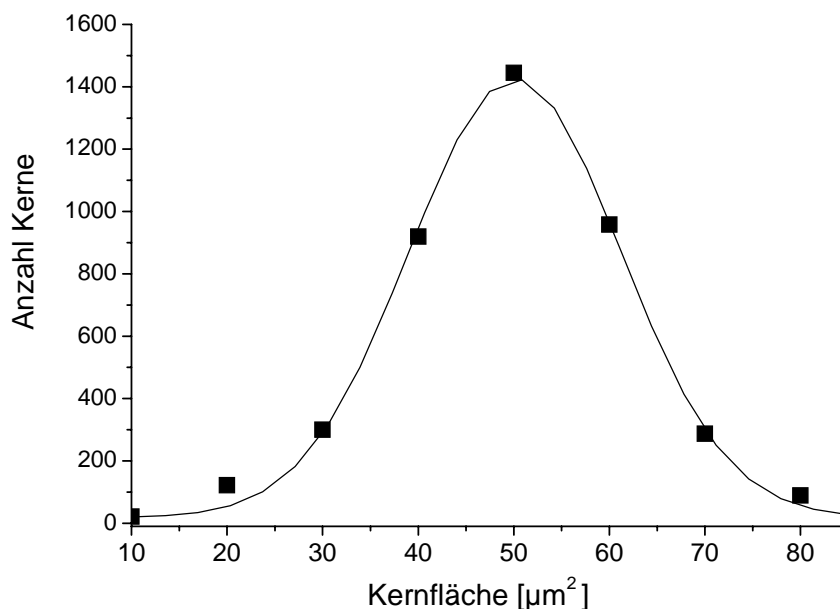


Abb. 4.1.1: Verteilung der Zellkernflächen von konfluenten, ruhenden RAW 264.7 Makrophagen (2×10^6 Zellen in 3 cm Petrischalen). Die meisten Zellkerne wiesen eine Fläche von $51 \mu\text{m}^2$ auf, einige wenige Kerne wurden mit weniger als $25 \mu\text{m}^2$ gemessen. Ein kleiner Teil der RAW-Zellen wies eine Kernfläche von mehr als $80 \mu\text{m}^2$ auf.

Die Messung der Kernflächen von konfluenten, ruhenden RAW 264.7 Makrophagen ergab eine mittlere Kernfläche von $51 \pm 14 \mu\text{m}^2$.

Für die Berechnung der mittleren Trefferanzahl pro Zellkern wurden die Fluenzen der Kohlenstoffstrahlung und die Kernflächengröße benötigt. Da die Verteilung der Teilchen einer Poisson-Statistik folgt ist es möglich, die Kerntreffer-Wahrscheinlichkeit für die jeweiligen Fluenzen ausrechnen (siehe Abschnitt 2.4, Formel 3). Die Wahrscheinlichkeit für Kerntreffer in RAW 264.7 Makrophagen bei Bestrahlung mit $9,8 \text{ MeV/u}$ Kohlenstoffionen ist in Tabelle 4.1 dargestellt.

Tabelle 4. 1: Wahrscheinlichkeit für Kerntreffer in RAW 264.7 Makrophagen bei Bestrahlung mit $9,8 \text{ MeV/u}$ Kohlenstoffionen (LET $170 \text{ keV}/\mu\text{m}$).

9,8 MeV/u Kohlenstoffionen [LET $170 \text{ keV}/\mu\text{m}$]						
Dosis [Gy]	Fluenz [T/cm^2]	0 Treffer	1 Treffer	2 Treffer	≥ 3 Treffer	Treffer/Zelle
0,25	$9,2 \times 10^5$	63%	29%	7%	1%	0,5
0,5	$1,8 \times 10^6$	40%	37%	17%	7%	0,9
0,75	$2,8 \times 10^6$	25%	35%	27%	16%	1,4
1	$3,7 \times 10^6$	16%	29%	27%	28%	1,8
2	$7,4 \times 10^6$	3%	9%	17%	71%	3,7
4	$1,5 \times 10^7$	0%	0%	2%	98%	7,4
8	3×10^7	0%	0%	0%	100%	14,8

Die Verteilung der Kerntrefferwahrscheinlichkeiten zeigte, dass bei Bestrahlung mit niederenergetischen Kohlenstoffionen im Dosisbereich von $0,25 \text{ Gy}$ bis 2 Gy ein Teil der Makrophagenpopulation nicht getroffen wurde. Erst bei Dosen über 2 Gy wurden alle Zellkerne getroffen.

4.1.2 Bestimmung der Zellkernflächen und Trefferzahl in humanen Lymphozyten

Die Bestrahlung humaner Lymphozyten erfolgte mit 100 MeV/u Kohlenstoffionen (LET=29 KeV/ μm). Der Radius der Teilchenspurs dieser hochenergetischen Kohlenstoffionen beträgt 105 μm (siehe Kapitel 3.8.1). Die Verteilung der Kernflächengröße ist in Abbildung 4.1.2 dargestellt.

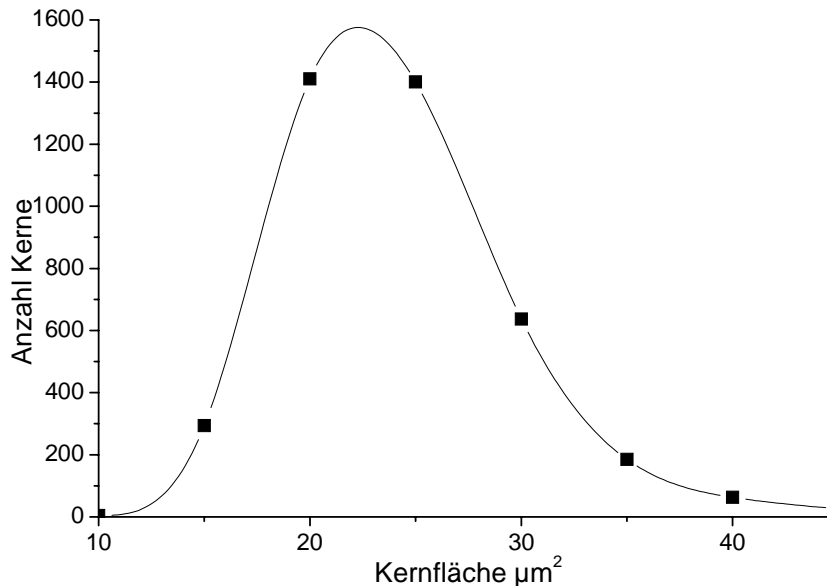


Abb. 4.1.2: Verteilung der Kernflächengröße frisch isolierter, humaner Lymphozyten in der G_0 -Phase.

Die mittlere Kernfläche betrug $(22 \pm 5) \mu\text{m}^2$. Die Zellkernflächen von humanen Lymphozyten sind im Durchschnitt deutlich kleiner als die Kernflächen muriner RAW 264.7 Makrophagen. Die Trefferwahrscheinlichkeiten bei humanen, ruhenden Lymphozyten sind in Tabelle 4.2 dargestellt.

Tabelle 4.2: Wahrscheinlichkeiten für Kerntreffer bei ruhenden humanen Lymphozyten bei Bestrahlung mit 100 MeV/u Kohlenstoffionen (LET 29 keV/ μm).

100 MeV/u Kohlenstoffionen [LET 29 keV/ μm]						
Dosis [Gy]	Fluenz [T/cm^2]	0 Treffer	1 Treffer	2 Treffer	≥ 3 Treffer	Mittlere Trefferzahl
1	$2,2 \times 10^7$	1%	4%	10%	85%	4,7
2	$4,3 \times 10^7$	0%	0%	0%	100%	9,5

Bei hochenergetischen Kohlenstoffstrahlen ist der Spurdurchmesser größer als der Zellkern eines Lymphozyten. Der Spurradius eines 100 MeV/u Kohlenstoffions beträgt 105 μm . Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass jeder Zellkern innerhalb der Spurradien mehrerer Kohlenstoffionen lag und somit im Mittel die gewünschte Dosis erhielt, auch wenn bei einer Fluenz von $2,2 \times 10^7$ Teilchen/ cm^2 ca. 1 % der

Zellkerne nicht in dem Zentrum einer Teilchenspur lag. Bei einer Fluenz von $4,3 \times 10^6$ Kohlenstoffionen/cm² (2 Gy) ist davon auszugehen, dass jeder Zellkern getroffen wurde.

4.1.3 Wachstumskurven muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung

Für die Bestimmung der Strahlensensitivität muriner RAW 264.7 Makrophagen wurden zunächst Wachstumskurven nach Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen erstellt. Wie Abbildung 4.1.3 zeigt, stieg die Zellzahl unbestrahlter Makrophagen im Untersuchungszeitraum (0-72 h) an.

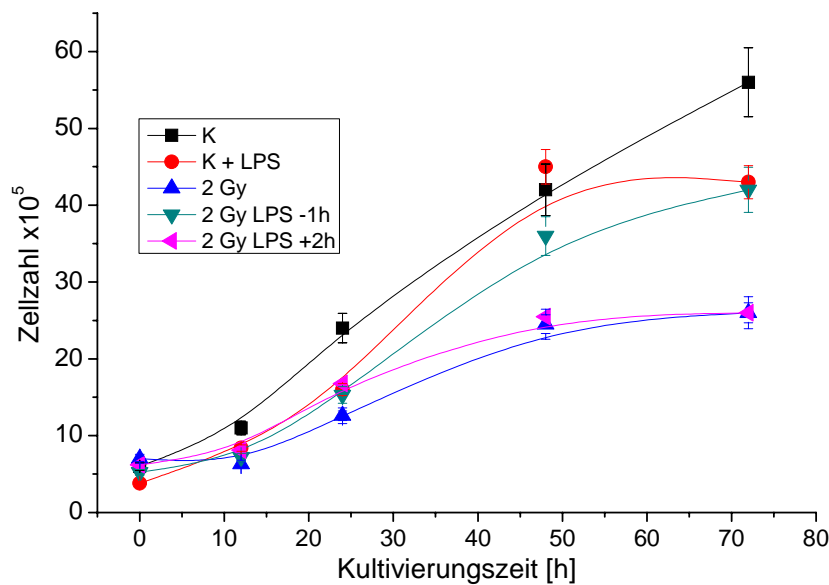


Abb. 4.1.3: Wachstumskurven muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung mit 2 Gy Röntgenbestrahlung. Die Zellzählung erfolgte mit dem Trypan-Blue-Assay. Als Kontrolle dienten unbestrahlte Makrophagen (K) und unbestrahlte, LPS-aktivierte Makrophagen (K + LPS). Die LPS-Zugabe (1 µg/ml) zu der unbestrahlten Kontrolle erfolgte direkt nach der Aussaat. Ein Teil der bestrahlten RAW-Zellen wurde 1 h vor Beginn der Bestrahlung mit LPS aktiviert (2 Gy LPS -1 h) bzw. 2 h nach Ende der Bestrahlung (2 Gy LPS +2 h). Eine dritte Gruppe bestrahlter RAW Zellen erhielt kein LPS (2 Gy). Ausgesät wurden 5×10^5 Zellen in 25 cm² Zellkulturflaschen. Die Fehlerbalken stellen den arithmetischen Mittelwert zweier parallel gemessener Kulturen dar.

LPS aktivierte, unbestrahlte Zellen wuchsen etwas langsamer, nach 48 h Kultivierung konnte kein Wachstum mehr beobachtet werden. RAW-Zellen, die mit 2 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt wurden, zeigten eine deutlich verminderte Wachstumsrate im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen. Die Zellzahl der mit 2 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen nach 72 h betrug $2,6 \times 10^6$, die der unbestrahlten Kontrolle $5,6 \times 10^6$. Das Zellwachstum der bestrahlten Zellen war um 54 % reduziert, im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle.

Makrophagen, die 1 h vor Beginn der Bestrahlung mit 1 µg/ml LPS aktiviert wurden, wiesen eine höhere Wachstumsrate auf als bestrahlte, nicht aktivierte

Makrophagen. Nach 72 h Kultivierung betrug die Zellzahl in den aktivierten, bestrahlten Kulturen $4,6 \times 10^6$ gegenüber $2,6 \times 10^6$ in den nicht aktivierten, bestrahlten Kulturen. Das Wachstum der LPS-aktivierten, bestrahlten Zellen war um 180 % gegenüber den nicht aktivierten, bestrahlten Makrophagen erhöht. Die Zugabe von $1 \mu\text{g/ml}$ LPS 1 h vor Beginn der Bestrahlung zeigte einen deutlichen radioprotektiven Effekt in Bezug auf das Zellwachstum.

Makrophagen, die 2 h nach der Bestrahlung mit LPS aktiviert wurden, zeigten einen ähnlichen Verlauf des Zellwachstums wie nicht stimulierte, bestrahlte Zellen. Der radioprotektive Effekt der LPS Aktivierung zeigte sich nicht. Daraus leitet sich ab, dass die Aktivierung vor der Bestrahlung essentiell für den radioprotektiven Effekt von LPS auf Makrophagen ist und eine nachträgliche Aktivierung keinen Einfluss auf die Entwicklung des Zellwachstums hat.

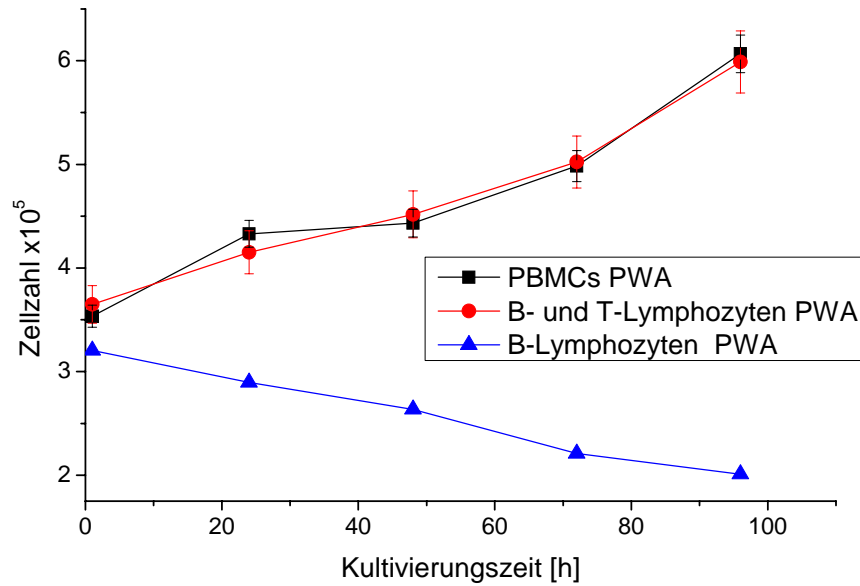
4.1.4 Wachstumskurven humaner B- und T-Lymphozyten nach mitogener Aktivierung

Für die Untersuchung chromosomaler Aberrationen in humanen Lymphozyten werden proliferierende Zellen benötigt. Generell befinden sich Lymphozyten im Blut in der G_0 -Phase des Zellzyklus und müssen daher zur Proliferation aktiviert werden. Für die Aktivierung humaner Lymphozyten werden verschiedene polyklonale Mitogene verwendet, wie Phytohämagglutinin (PHA) und Pokeweed-Mitogen (PWA) (siehe Kapitel 3.4). Diese Mitogene haben eine unterschiedliche Wirkung auf die verschiedenen Subpopulationen der Lymphozyten (Greaves et al., 1972; Janossy et al., 1972). PHA gilt als hauptsächlich T-Zell aktivierend, PWA aktiviert sowohl T-Zellen als auch B-Zellen. Der Effekt dieser Mitogene auf humane Lymphozyten wurde mit Hilfe von Wachstumskurven über einen Zeitraum von 0 h bis 96 h nach Zugabe der Mitogene bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.1.4 (A) und (B) dargestellt.

Die Wachstumskurven humaner PBMCs und der gemischten B- und T-Lymphozytenkultur nach Stimulation mit PHA und PWA zeigen, dass das Vorhandensein von Monozyten keinen Einfluss auf die Wachstumsrate der Lymphozyten hat. Die PBMC-Kultur und die B- und T-Lymphozytenkultur zeigen den gleichen Anstieg in der Zellzahl über den beobachteten Zeitraum hinweg, sowohl nach Stimulierung mit PHA als auch mit PWA. Die PHA stimulierten Zellen wuchsen etwas schneller als die PWA stimulierten Zellen. Die Zellzahl der PHA-stimulierten PBMC-Kultur betrug am Ende der Messung $7,2 \times 10^6$, in der PWA-stimulierten PBMC und B-T-Lymphozyten-Kultur betrug sie 6×10^6 .

Isolierte B-Lymphozyten zeigten weder bei Stimulierung mit PHA noch bei Stimulierung mit PWA ein Wachstum. Für die Stimulierung von B-Lymphozyten mit PWA sind T-Lymphozyten zwingend erforderlich. Dies bestätigt die Ergebnisse von Greaves et al. (1972a; 1972b).

(A)



(B)

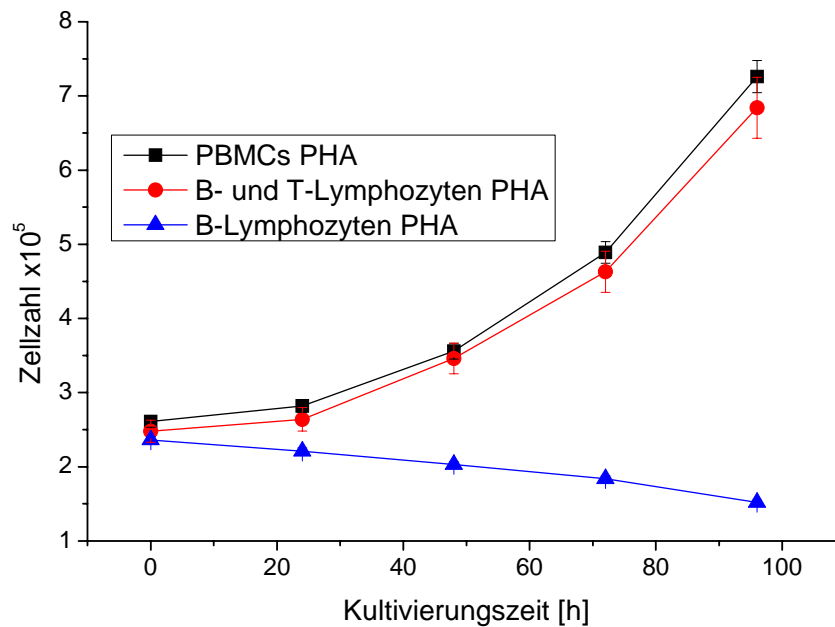


Abb. 4.1.4: Wachstumskurven humaner Lymphozyten nach Stimulierung mit (A) 2,5 µg/ml Pokeweed-Mitogen (PWA) bzw. (B) 1 % Phytohämagglutinin (PHA). Bestimmt wurde die Gesamtzellzahl. Es wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) eines gesunden weiblichen Spenders verwendet, die PBMCs enthielten neben den Lymphozyten noch Monozyten. B-Lymphozyten wurden mit Hilfe magnetischer Beads isoliert. Die gemischte B- und T-Lymphozytenkultur wurde durch Depletierung der Monozyten aus den PBMCs isoliert. Die Fehlerbalken stellen den arithmetischen Mittelwert zweier parallel gemessener Kulturen dar.

4.2 Zellvitalität humaner und muriner Makrophagen nach Exposition ionisierender Strahlung

Die Bestimmung der Zellvitalität strahlenexponierter Makrophagen erfolgte durch die Messung der Aktivität zellulärer Dehydrogenasen. Hierfür wurde der MTT-Test verwendet (siehe Abschnitt 3.14). Die Makrophagen wurden nach Ende der Bestrahlung für 24 h bzw. 48 h in An- oder Abwesenheit von LPS kultiviert und die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen bestimmt. Da die Aktivität der an der Atmungskette beteiligten Dehydrogenasen essentiell für die Homöostase der Zelle ist, lässt sich durch die Messung der Dehydrogenase-Aktivität direkt auf die Zellvitalität schließen.

4.2.1 Zellvitalität muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen

Die Bestrahlung von murinen RAW 264.7 Makrophagen mit 250 kV Röntgenstrahlen induzierte nur eine schwache Reduktion der MTT-Aktivität über den Dosisbereich von 0,25 Gy bis hin zu 32 Gy (Abb. 4.2.1). LPS-aktivierte Makrophagen zeigten gegenüber den ruhenden Makrophagen eine leicht erhöhte MTT-Aktivität. Nach Bestrahlung mit 32 Gy Röntgenstrahlen reduzierte sich die MTT-Aktivität LPS-aktivierter Makrophagen um $11 \pm 3 \%$, in nicht-aktivierten Makrophagen reduzierte sich die MTT-Aktivität nach Bestrahlung mit 32 Gy Röntgenstrahlen um $17 \pm 4 \%$. Im Dosisbereich von 0,25 Gy bis 4 Gy war die Reduktion der Zellvitalität nicht -aktivierter Makrophagen ausgeprägter im Vergleich zu den LPS-aktivierten Makrophagen. Im Dosisbereich von 8 Gy bis 16 Gy war die Zellvitalität nicht-aktivierter und LPS aktivierter Makrophagen annähernd gleich. Die LPS-Aktivierung hatte einen radioprotektiven Effekt auf die murinen Makrophagen, vor allem im Dosisbereich von 0,25 Gy bis 4 Gy.

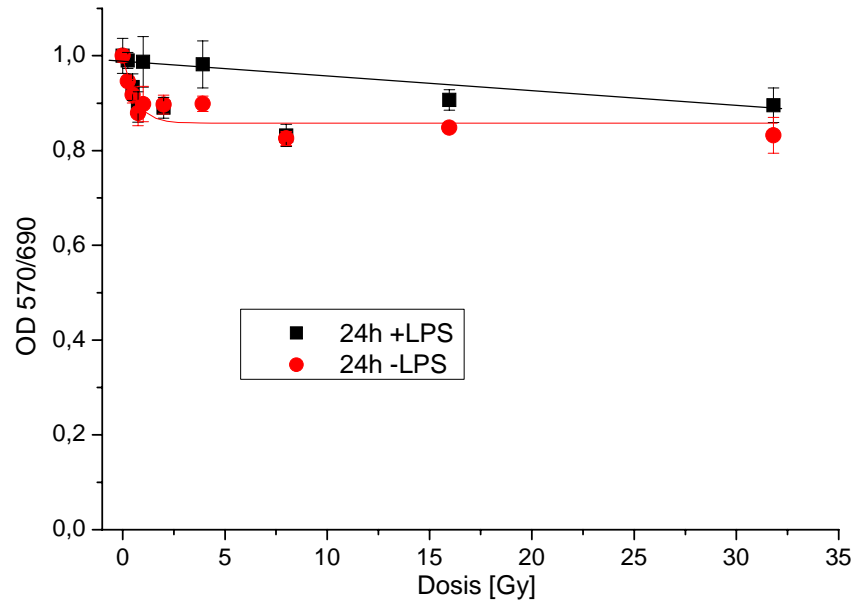


Abb. 4.2.1: Bestimmung der Zellvitalität mittels MTT-Test muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen. Die Messung der Zellvitalität erfolgte 24 h nach Ende der Bestrahlung. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler zweier parallel gemessener Kulturen.

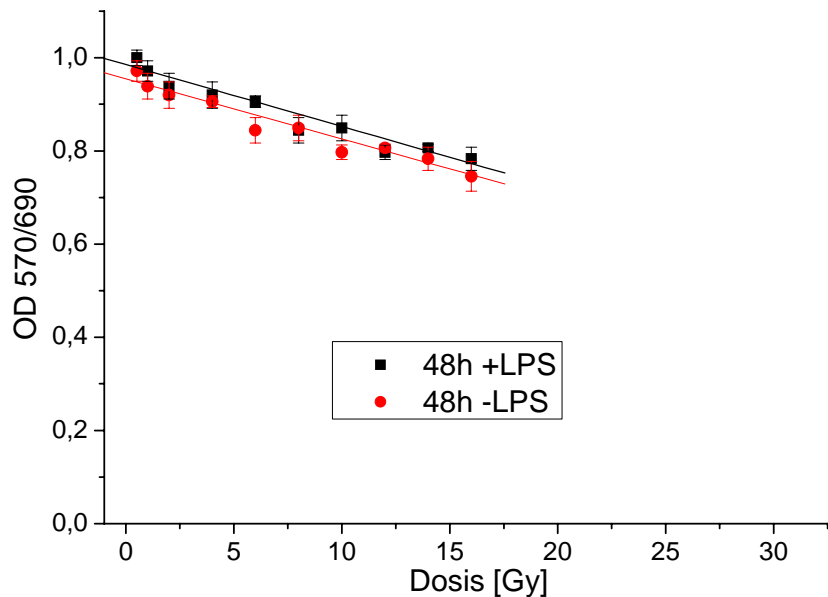


Abb. 4.2.2: Bestimmung der Zellvitalität (MTT-Test) muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen. Die Messung der Zellvitalität erfolgte 48 h nach Ende der Bestrahlung. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler zweier parallel gemessener Kulturen.

Auch 48 h nach Ende der Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen zeigte sich nur eine schwache Reduktion der MTT-Aktivität (Abbildung 4.2.2). LPS-aktivierte Makrophagen besaßen jedoch im Dosisbereich von 0,25 Gy bis 4 Gy keine erhöhte MTT-Aktivität im Vergleich zu nicht-aktivierten Makrophagen, wie dies nach 24 h

zu beobachten war. Ein radioprotektiver Effekt der LPS-Aktivierung war nicht mehr erkennbar. Aktivierte Makrophagen zeigten eine Reduktion der MTT-Aktivität von $27 \pm 3 \%$, nicht-aktivierter Makrophagen eine Reduktion von $26 \pm 2 \%$.

Diese Daten machen deutlich, dass murine RAW 264.7 Makrophagen keine deutliche Reduktion ihrer Zellvitalität nach Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen aufweisen. Weiterhin erhöht die Zugabe von $1 \mu\text{g/ml}$ LPS die Zellvitalität der bestrahlten Makrophagen im Dosisbereich von 0,25 Gy bis 4 Gy, gemessen 24 h nach Ende der Bestrahlung.

4.2.2 Zellvitalität muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung mit 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen

In nicht-aktivierten und LPS-aktivierter muriner RAW 264.7 Makrophagen wurde 24 h nach Bestrahlung mit niederenergetischen Kohlenstoffionen (9,8 MeV/u; LET = $170 \text{ KeV}/\mu\text{m}$) eine schwache Reduktion der MTT-Aktivität über den Dosisbereich von 0,25 Gy bis 32 Gy (Abb. 4.2.3), gemessen. In Zellen die 32 Gy Kohlenstoffionen erhielten, reduzierte die MTT-Aktivität um $12 \pm 5 \%$ bzw. um $24 \pm 1,5 \%$. Die gleiche Dosis Kohlenstoffionen war effektiver als 250 kV Röntgenstrahlung. Wie auch nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen zu sehen war, hatte die Aktivierung mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS einen radioprotektiven Effekt auf die Makrophagen, vor allem im Dosisbereich von 0,25 Gy bis 4 Gy. Dennoch ist festzuhalten, dass selbst Dosen von 32 Gy Kohlenstoffionen die Zellvitalität nur um Maximal $\sim 25\%$ reduzieren konnte.

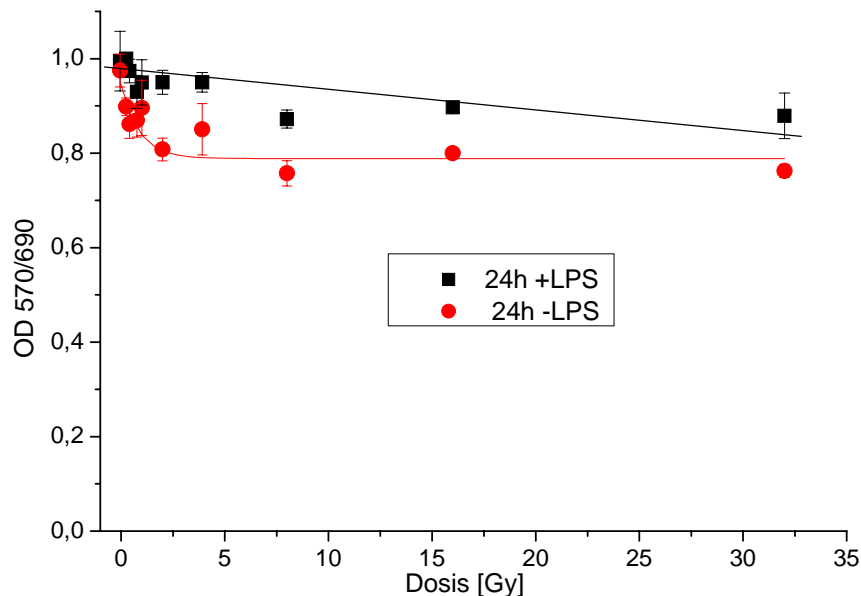


Abb. 4.2.3: Bestimmung der Zellvitalität (MTT-Test) muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung mit 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen. Die Messung der Zellvitalität erfolgte 24 h nach Ende der Bestrahlung. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler dreier parallel gemessener Kulturen.

In weiteren Versuchen wurde auch die MTT-Aktivität nach 48 h Inkubation untersucht (Abb. 4.2.4). Makrophagen, die mit 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen bestrahlt wurden, zeigten nach 48 h eine deutliche Reduktion ihrer Zellvitalität im Dosisbereich von 0,25 Gy bis 2 Gy. Die LPS-Aktivierung hatte keinen radioprotektiven Effekt mehr auf die Makrophagen nach 48 h Kultivierung. Nach 32 Gy Kohlenstoffionen reduzierte die MTT-Aktivität um $47 \pm 2 \%$ in LPS-aktivierten Zellen, sowie um $40 \pm 2 \%$ in nicht-aktivierten Zellen. Niederenergetische Kohlenstoffionen reduzierten die Zellvitalität muriner Makrophagen 2-fach effektiver als Röntgenstrahlung, jedoch nur nach 48 h Inkubation. Die MTT-Aktivität fiel jedoch nicht linear mit der applizierten Dosis. Ab einer Dosis von 4 Gy reduzierte sich die MTT-Aktivität nicht weiter bei weiter steigender Dosis.

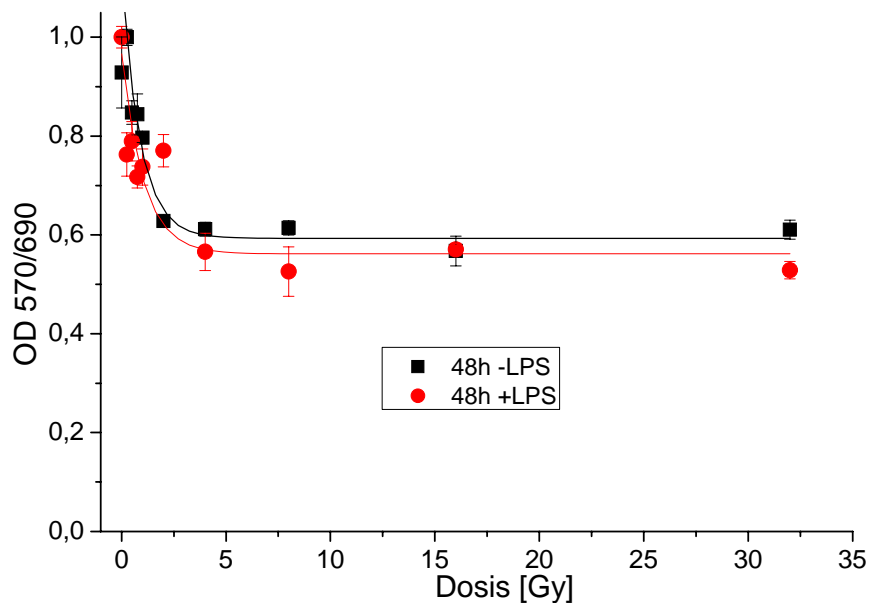


Abb. 4.2.4: Bestimmung der Zellvitalität (MTT-Test) muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung mit 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen. Die Messung der Zellvitalität erfolgte 48 h nach Ende der Bestrahlung. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler zweier parallel gemessenen Kulturen.

Die Messung der Zellvitalität von murinen Makrophagen zeigte, dass Makrophagen eine hohe Strahlenresistenz aufweisen und dass sich diese nach Aktivierung mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS erhöhte. Dieser radioprotektive Effekt des LPS ist jedoch nur in den ersten 24 h nach Ende der Bestrahlung messbar. Nach 48 h Kultivierung ist kein Unterschied mehr zwischen nicht-aktivierten und LPS-aktivierten Zellen feststellbar. Weiterhin ist festzuhalten, dass in Makrophagen die 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen erhielten die Zellvitalität stärker zurückging, als dies nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen der Fall war.

4.2.3 Zellvitalität humaner Makrophagen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen

Um die Strahlensensitivität von RAW-Zellen mit der von primären Makrophagen vergleichen zu können, erfolgte die Messung der Zellvitalität mit Blutmonozyten, die mindestens für 4 Tage *in vitro* kultiviert wurden, um sie in Makrophagen zu differenzieren. Die Messung wurde wieder mit Hilfe des MTT-Tests durchgeführt (siehe Abschnitt 3.14). Humane Monozyten-derivierte Makrophagen (MDM) zeigten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen eine leichte Reduktion ihrer Zellvitalität (Abb. 4.2.5).

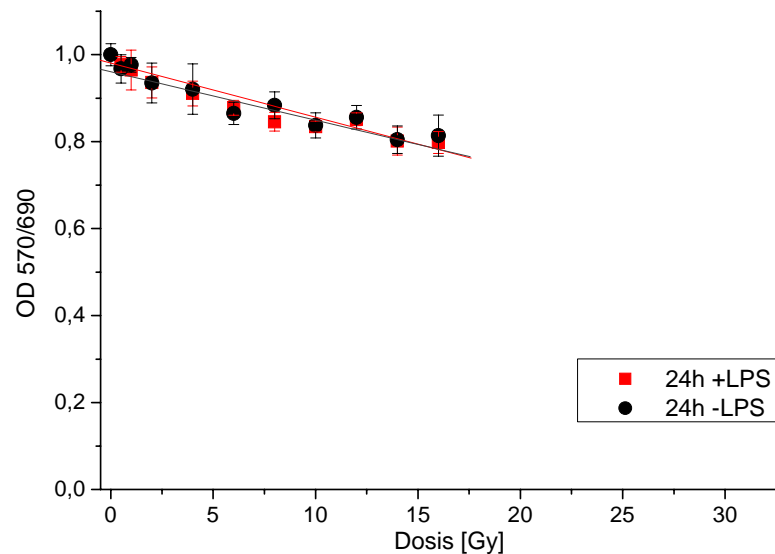


Abb. 4.2.5: Zellvitalität primärer humaner Monozyten nach 4 Tagen *in vitro* Differenzierung in Makrophagen. Die Messung der Zellvitalität erfolgte mit dem MTT-Test 24 h nach Ende der Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler zweier parallel gemessener Kulturen.

Applikation von 16 Gy 250 kV Röntgenstrahlen reduzierte die MTT-Aktivität ruhender und LPS-aktivierter MDM um $20 \pm 2 \%$ bzw. $19 \pm 1 \%$. Die Zellvitalität nicht-aktivierter und LPS-aktivierter humaner MDM nach Bestrahlung erreichte somit dasselbe Niveau wie nicht-aktivierte, bestrahlte RAW 264.7 Makrophagen. Es konnte jedoch kein radioprotektiver Effekt der LPS-Aktivierung festgestellt werden, wie dies bei LPS-aktivierten RAW-Makrophagen der Fall war. Die Messung der MTT-Aktivität nach 48 h Inkubation zeigte, dass nicht-aktivierte und LPS-aktivierte MDM die gleiche Zellvitalität aufweisen (Abb.4.2.6).

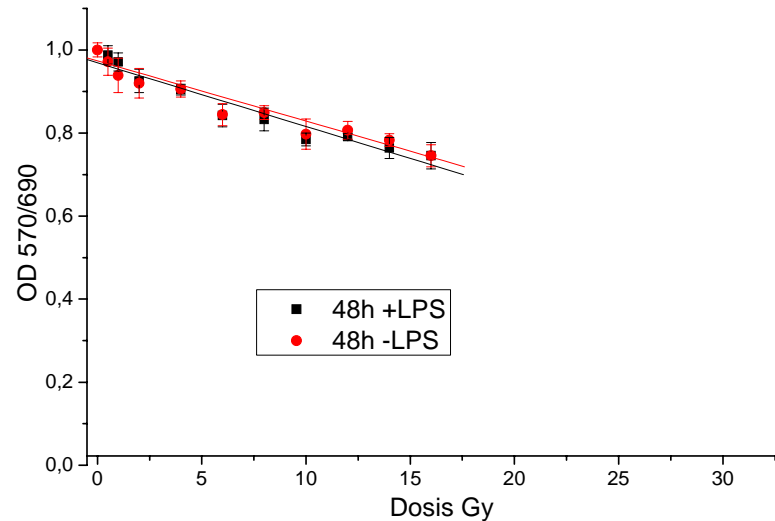


Abb. 4.2.6: Zellvitalität primärer humaner Monozyten nach 4 Tagen *in vitro* Differenzierung in Makrophagen. Die Messung der Zellvitalität erfolgte 48 h nach Ende der Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler zweier parallel gemessener Kulturen.

Die MTT-Aktivität LPS-aktivierter MDM nach Bestrahlung mit 16 Gy 250 kV Röntgenstrahlen wurde um 26 ± 3 % reduziert, die MTT-Aktivität nicht-aktivierter MDM um 26 ± 1 %. Auch nach 48 h konnte kein radioprotektiver Effekt der LPS-Aktivierung festgestellt werden. Humane MDM und murine RAW-Makrophagen zeigten eine fast identische Reduktion ihrer Zellvitalität, es konnte jedoch bei murinen Makrophagen ein radioprotektiver Effekt der LPS-Aktivierung auf die Zellvitalität gezeigt werden (siehe Abbildungen 4.2.1 und 4.2.3). Dieser Effekt zeigte sich jedoch nur, wenn die Messung der Zellvitalität 24 h nach Ende der Bestrahlung erfolgte. Erfolgte die Messung nach 48 h, konnte kein Unterschied in der Zellvitalität nicht-aktivierter und LPS-aktivierter muriner RAW Makrophagen und humaner MDM festgestellt werden.

4.2.4 Zellvitalität humaner Makrophagen nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen

Ebenso wie nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen verursachten niederenergetische Kohlenstoffstrahlen eine leichte Abnahme der MTT-Aktivität und damit der Zellvitalität in humanen MDM. Das Ergebnis eines Experiments ist in Abbildung 4.2.7 dargestellt.

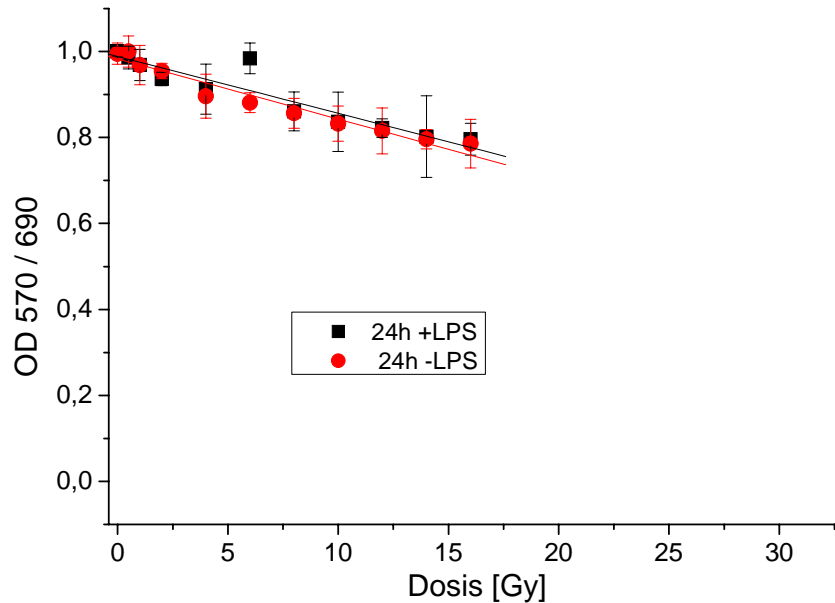


Abb. 4.2.7: Zellvitalität primärer humaner MDM nach 4 Tagen *in vitro* Differenzierung. Die Messung der Zellvitalität erfolgte mit dem MTT-Test 24 h nach Ende der Bestrahlung mit 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler zweier parallel gemessener Kulturen.

LPS-aktivierte und nicht-aktivierte humane MDM wiesen nach Bestrahlung die gleiche Abnahme ihrer Zellvitalität auf. Die LPS-Zugabe hatte keinen Einfluss auf die Zellvitalität in humanen MDM, sie sank in beiden Fällen um 20 ± 2 %. Kohlenstoffionen waren genauso effektiv wie Röntgenstrahlen.

4.2.5 Zellvitalität humaner Fibroblasten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen

Um die Zellvitalität humaner und muriner Makrophagen mit anderen Zelltypen vergleichen zu können, wurden auch primäre humane Vorhautfibroblasten AG1522D untersucht. Als Testverfahren wurde wieder der MTT-Test verwendet. Die Zellvitalität der AG1522D Fibroblasten wurde 24 h nach Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen gemessen. In den Fibroblasten wurde diese stärker reduziert als dies bei humanen und murinen Makrophagen der Fall war. (Abb. 4.2.8).

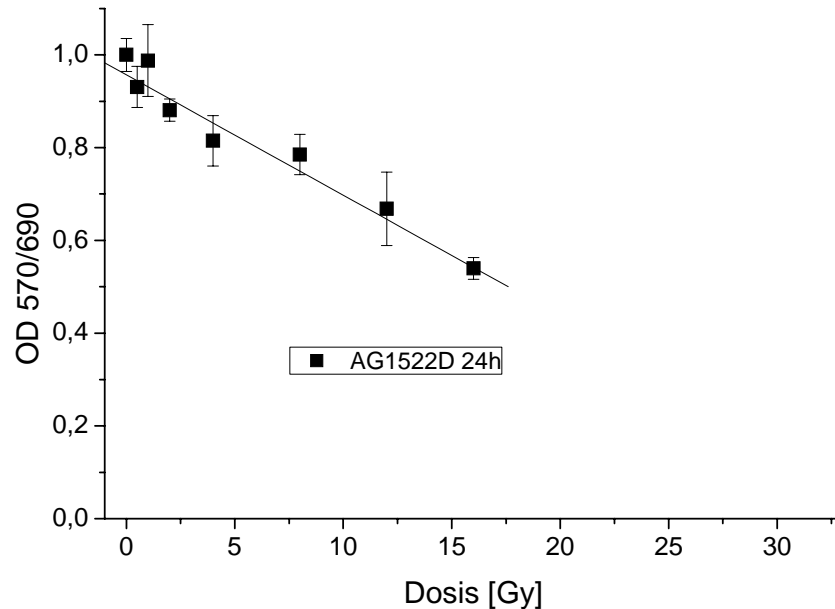


Abb. 4.2.8: Zellvitalitätsmessung primäre humane AG1522D Fibroblasten, gemessen mit dem MTT-Test. Die Messung erfolgte 24 h nach Ende der Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen. Dargestellt ist das arithmetische Mittel eines repräsentativen Ergebnisses \pm Standardfehler dreier parallel gemessener Kulturen.

Bestrahlung mit 16 Gy Röntgenstrahlen reduzierte die Zellvitalität von Fibroblasten um 48 ± 2 %. Humane Fibroblasten sind somit radiosensitiver als murine und humane Makrophagen.

4.2.6 Zellvitalität humaner Lymphozyten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen

Periphere Lymphozyten gelten als besonders strahlensensitiv. Um die Strahlensensitivität von humanen peripheren Blutlymphozyten mit der von humanen und murinen Makrophagen vergleichen zu können, wurde diese ebenfalls mit dem MTT-Test untersucht (Abb.4.2.9).

Die Messung der Zellvitalität humaner Lymphozyten nach Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen zeigte eine dosisabhängige Abnahme. Die MTT-Aktivität 24 h nach Ende der Bestrahlung war um 52 ± 2 % reduziert, nach 48 h um 69 ± 2 %. Die Lymphozyten wiesen somit die größte Strahlensensitivität der vier untersuchten Zelltypen auf (murine Makrophagen, humane Makrophagen, humane Fibroblasten, humane Lymphozyten). Der Abfall der MTT-Aktivität humaner Lymphozyten 48 h nach Ende der Bestrahlung erfolgte nicht linear über den gesamten Dosisbereich. Im Dosisbereich von 0,5 Gy bis 4 Gy erfolgte ein steiler linearer Abfall, ab einer Dosis von 4 Gy bis 16 Gy sank die MTT-Aktivität kaum weiter.

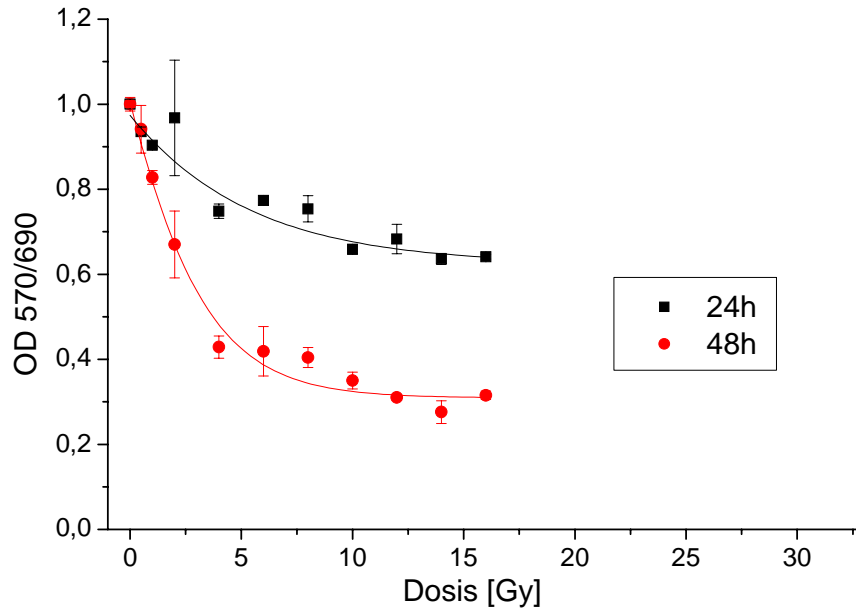


Abb. 4.2.9: Zellvitalitätsmessung unstimulierter primärer humaner Blutlymphozyten. Verwendet wurde der MTT-Test 24h und 48 h nach ende der Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler eines Experiments wieder, mit drei parallel gemessenen Kulturen.

4.3 Wirkung ionisierender Strahlen auf die TNF- α -Produktion von Makrophagen

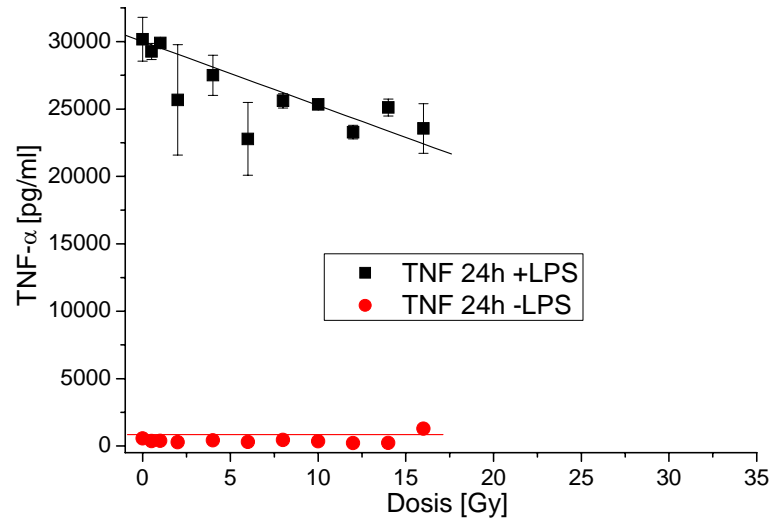
Makrophagen sezernieren nach Aktivierung mit LPS proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , das eines der bedeutendsten proinflammatorischen Zytokine ist. In strahleninduzierten inflammatorischen Erkrankungen wie Fibrose oder Pneumonitis, die als Nebenwirkung bei Strahlentherapien vorkommen können, wurde in dem entzündeten Gewebe TNF- α und IL-1 β nachgewiesen (Herskind et al., 1998; Haase et al., 2004; Rube et al., 2004a; Liu et al., 2006; Müller & Meinicke, 2007). Um zu untersuchen wie sich ionisierende Strahlung auf die Produktion von TNF- α auswirkt wurden *in vitro* Experimente mit humanen und murinen Makrophagen durchgeführt.

Es wurde zuerst untersucht, ob und wie die Bestrahlung mit Röntgenstrahlen die Zytokinproduktion moduliert. Hierfür wurde ein spezifischer ELISA verwendet und die TNF- α Menge im Zellkulturüberstand von Makrophagen 24 h bzw. 48 h nach Ende der Bestrahlung bestimmt.

4.3.1 TNF- α Produktion muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen

Zunächst wurde die Wirkung von 250 kV Röntgenstrahlen auf die RAW 264.7 Makrophagen ohne und mit LPS-Stimulierung untersucht. Die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente sind in Abbildung 4.3.1 (A) und (B) dargestellt.

(A)



(B)

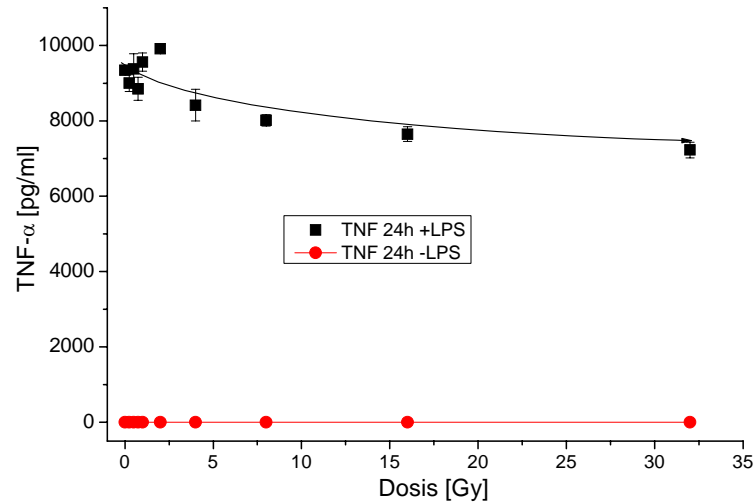


Abb. 4.3.1: Einfluss verschiedener Dosen 250 kV Röntgenstrahlen auf die TNF- α -Produktion muriner RAW 264.7 Makrophagen. 1×10^6 Zellen wurden mit verschiedenen Dosen Röntgenstrahlen bestrahlt. Ein Teil der Makrophagen wurde direkt im Anschluss an die Bestrahlung mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert und die TNF- α -Konzentration aller Kulturen 24 h nach Ende der Bestrahlung im Kulturüberstand der nicht-aktivierten bzw. LPS-aktivierten Makrophagen mit Hilfe eines ELISAs bestimmt. Dargestellt sind zwei unabhängige Experimente A und B mit deren arithmetischen Mittelwerten \pm Standardfehler. Die Anzahl der parallel gemessenen Proben war 2 bzw. 4.

Die produzierte Menge in Versuch A sank leicht mit steigender Dosis. In den Kulturen die mit 16 Gy bestrahlt wurden, nahm der Wert um 22 % gegenüber der unbestrahlten Kontrolle ab.

In Versuch B nahm die produzierte Menge ebenfalls mit steigender Dosis leicht ab, die Zellen die die höchste Dosis erhielten produzierten wie in Versuch A 22 % weniger TNF- α .

In keinem Versuch produzierten Makrophagen TNF- α ohne LPS Aktivierung. Die Bestrahlung mit Röntgenstrahlen alleine ist nicht ausreichend, um die Makrophagen zur Zytokin-Produktion anzuregen. Dies widerspricht einigen früheren *in vitro* Ergebnissen von Iwamoto & McBride (1994) und Hallahan et al. (1991) bzw. bestätigt die Ergebnisse von McKinney et al. (2000).

4.3.2 TNF- α -Produktion muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung mit 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen

Ebenso wie nach Röntgenbestrahlung wurde die Modulation der TNF- α -Produktion muriner Makrophagen nach Bestrahlung mit niederenergetischen Kohlenstoffionen 24 h nach Ende der Bestrahlung untersucht. Die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente sind in Abbildung 4.3.2 (A) und (B) dargestellt.

In Versuch A nahm der Wert in LPS-aktivierten Makrophagen mit zunehmender Dosis leicht ab. Die Kulturen die die höchste Dosis erhielten sezernierten 20 % weniger TNF- α .

In Versuch B war die Abnahme der TNF- α -Produktion nicht so ausgeprägt wie in Versuch A, sie sank um lediglich 7%. Obwohl sich der Verlauf der Zytokin-Produktion im Dosisbereich von 0,25 Gy bis 4 Gy in den gezeigten zwei Experimenten leicht unterschiedlich zeigt, kann anhand der erreichten Mengen in den hoch bestrahlten Zellen davon ausgegangen werden, dass die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen keinen signifikanten Einfluss auf die LPS-aktivierte TNF- α -Produktion hat.

In beiden Versuchen konnte weiterhin gezeigt werden, dass Makrophagen, die nicht mit LPS aktiviert wurden, keine TNF- α -Produktion aufwiesen. Dies konnte schon bei den Experimenten mit Röntgenstrahlen gezeigt werden. Niederenergetische Kohlenstoffionen oder Röntgenstrahlen konnten die Makrophagen nicht aktivieren.

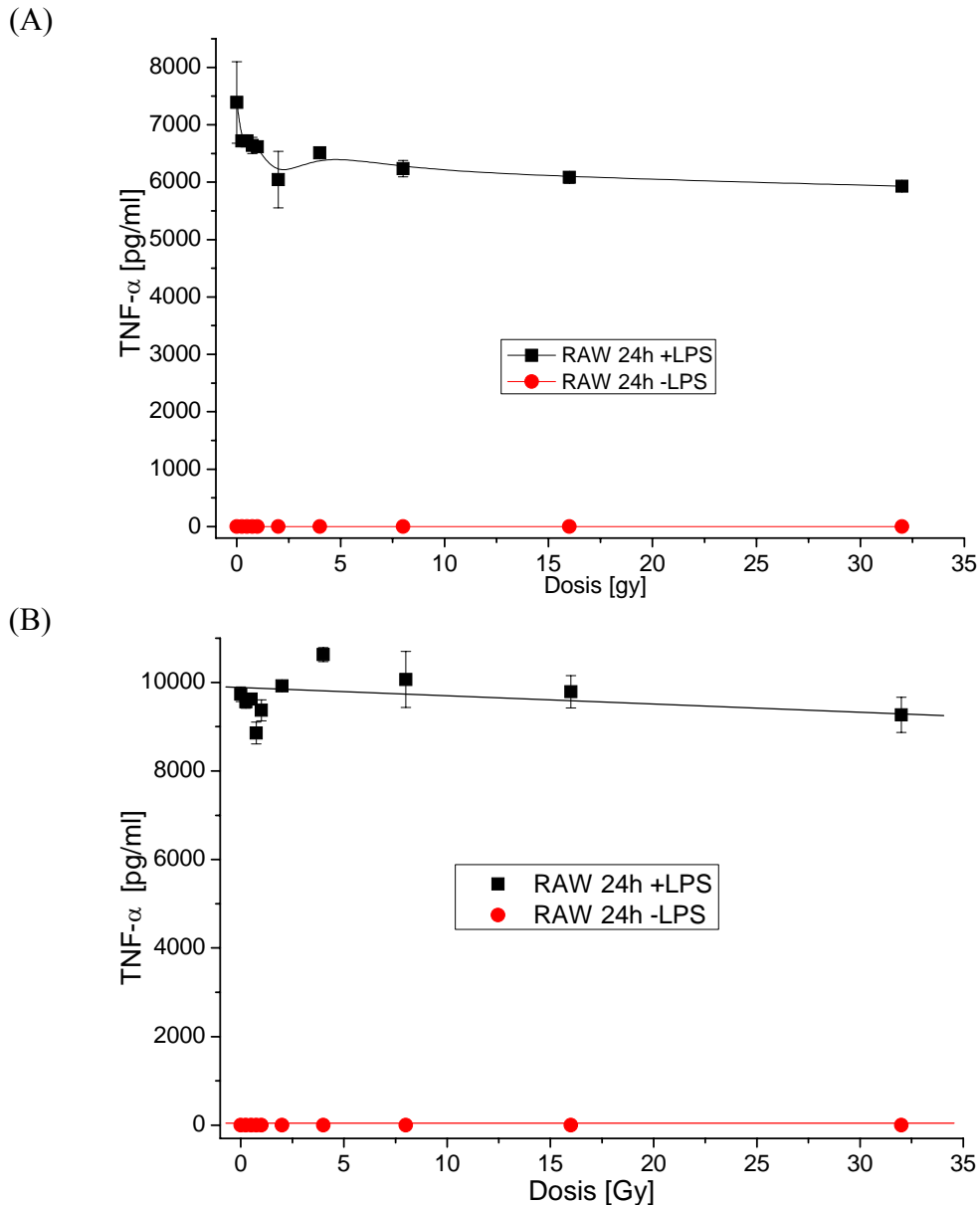


Abb. 4.3.2: Einfluss verschiedener Dosen 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen auf die TNF- α -Produktion muriner RAW 264.7 Makrophagen. 1×10^6 Zellen wurden mit unterschiedlichen Dosen von Kohlenstoffionen bestrahlt. Ein Teil der Makrophagen wurde direkt im Anschluss an die Bestrahlung mit 1 μ g/ml LPS stimuliert und die TNF- α -Konzentration im Kulturüberstand aller Kulturen 24 h nach Ende der Bestrahlung mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experiment A und B mit deren arithmetischen Mittelwerten \pm Standardfehler von jeweils 4 parallelen Kulturen pro Versuch.

Um zu untersuchen, ob unstimulierte Makrophagen zu späteren Zeitpunkten eine strahleninduzierte TNF- α -Produktion aufweisen, wurde diese auch nach 48 h Inkubation im Überstand bestimmt. Das Ergebnis eines Experiments ist in Abbildung 4.3.3 gezeigt

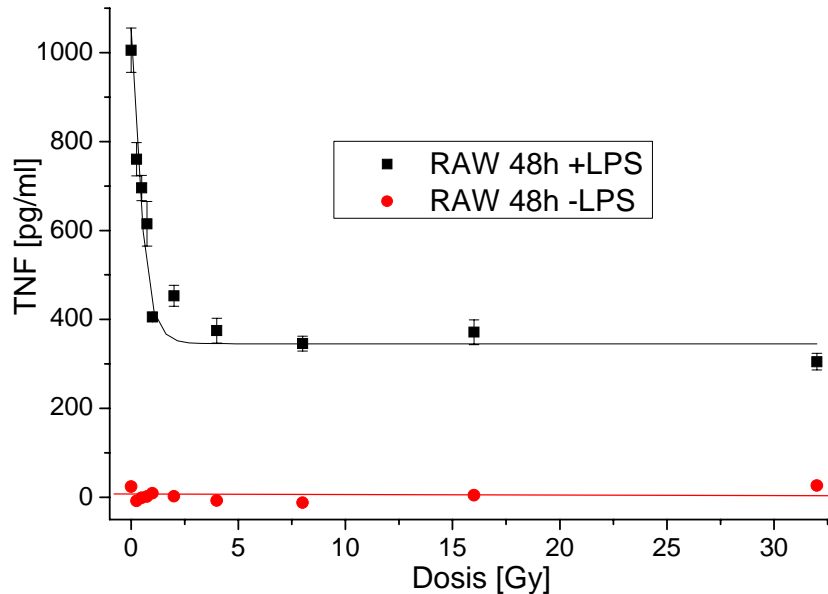


Abb. 4.3.3: Einfluss verschiedener Dosen 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen auf die TNF- α -Produktion muriner RAW 264.7 Makrophagen. 1×10^6 Zellen wurden mit unterschiedlichen Dosen bestrahlt. Ein Teil der Makrophagen wurde direkt im Anschluss an die Bestrahlung mit 1 μ g/ml LPS stimuliert und die TNF- α Konzentration im Kulturüberstand aller Kulturen 48 h nach Ende der Bestrahlung durch ELISA-Messung bestimmt. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experiments \pm Standardfehler mit jeweils 3 parallel gemessenen Kulturen pro Experiment.

Die TNF- α -Konzentration im Zellkulturüberstand nach 48 h Kultivierung war deutlich geringer als der nach 24 h gemessene Wert. Die produzierte Menge nahm im Bereich von 0,25 Gy bis 2 Gy mit steigender Dosis stark ab. Zellen, die mit 1 Gy Kohlenstoffionen bestrahlt wurden, wiesen 405 ± 10 pg/ml auf, Makrophagen die 32 Gy erhielten wiesen 305 ± 30 pg/ml TNF- α im Kulturüberstand auf. Unstimulierte, bestrahlte Makrophagen produzieren auch nach 48 h Kultivierung kein TNF- α .

4.3.3 TNF- α -Produktion humaner Makrophagen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen

Für die Untersuchung der Zytokinproduktion humaner Makrophagen wurden Monozyten aus dem Blut isoliert und 7 Tage in Kultur gehalten, um sie in Makrophagen differenzieren zu lassen. Die Differenzierung der humanen Monozyten in Makrophagen ist nötig, da primäre Monozyten kaum Zytokine Produzieren. Die Differenzierung geschah ohne Zugabe von stimulierenden Zytokinen oder Wachstumsfaktoren (siehe Kapitel 3.4.3).

Das Ergebnis eines repräsentativen Experiments nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen ist in Abbildung 4.3.4 dargestellt.

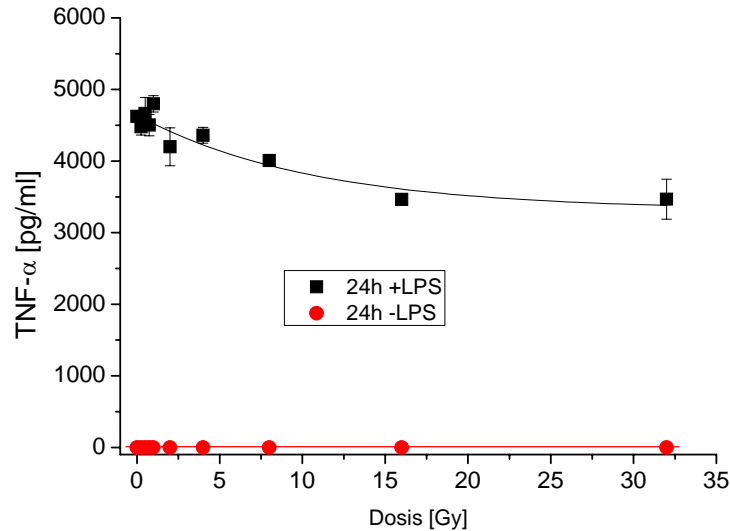


Abb.4.3.4: Einfluss verschiedener Dosen 250kV Röntgenstrahlen auf die TNF- α -Produktion humaner Makrophagen. 1×10^6 Zellen wurden mit verschiedenen Dosen Röntgenstrahlen bestrahlt. Ein Teil der Makrophagen wurde direkt im Anschluss an die Bestrahlung mit 1 μ g/ml LPS stimuliert und die TNF- α Konzentration 24 h nach Ende der Bestrahlung im Kulturüberstand aller Makrophagen mit Hilfe eines ELISAs bestimmt. Die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler stammen aus einem repräsentativen Experiment mit 4 parallel gemessenen Kulturen.

LPS-aktivierte, nicht-bestrahlte humane MDM sezernierten 4600 ± 40 pg/ml TNF- α in den Kulturüberstand. Die Konzentration nahm mit steigender Strahlendosis leicht ab. LPS-aktivierte Makrophagen, die 32 Gy erhielten, sezernierten 3450 ± 280 pg/m. Die TNF- α -Konzentration nahm somit um 25 % gegenüber der unbestrahlten Kontrolle ab.

Nicht-aktivierte MDM sezernierten keinerlei TNF- α in den Kulturüberstand. Auch bei humanen Makrophagen reichte die Bestrahlung alleine nicht aus, um eine TNF- α -Produktion anzuregen. Dies war auch bei den murinen RAW 264.7 Makrophagen der Fall. Ebenso war die Abnahme der TNF- α -Konzentration nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen von humanen und murinen Makrophagen nach LPS-Aktivierung vergleichbar. Murine Makrophagen zeigten eine Abnahme von 22%, humane Makrophagen um 25 %, jeweils nach 32 Gy Röntgenstrahlen.

4.3.4 TNF- α -Produktion humaner Makrophagen nach Bestrahlung mit 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen

Die Bestimmung der TNF- α Produktion humaner Makrophagen erfolgte mit *in vitro* differenzierten, primären MDM (siehe Kapitel 3.4.3). Die Differenzierungszeit betrug mindestens 4 Tage, es wurden keine stimulierende Zytokine während der Differenzierung zugesetzt.

Die Entwicklung der TNF- α Produktion nach Bestrahlung mit niederenergetischen Kohlenstoffionen ist in Abbildung 4.3.5 anhand zweier Experimente dargestellt.

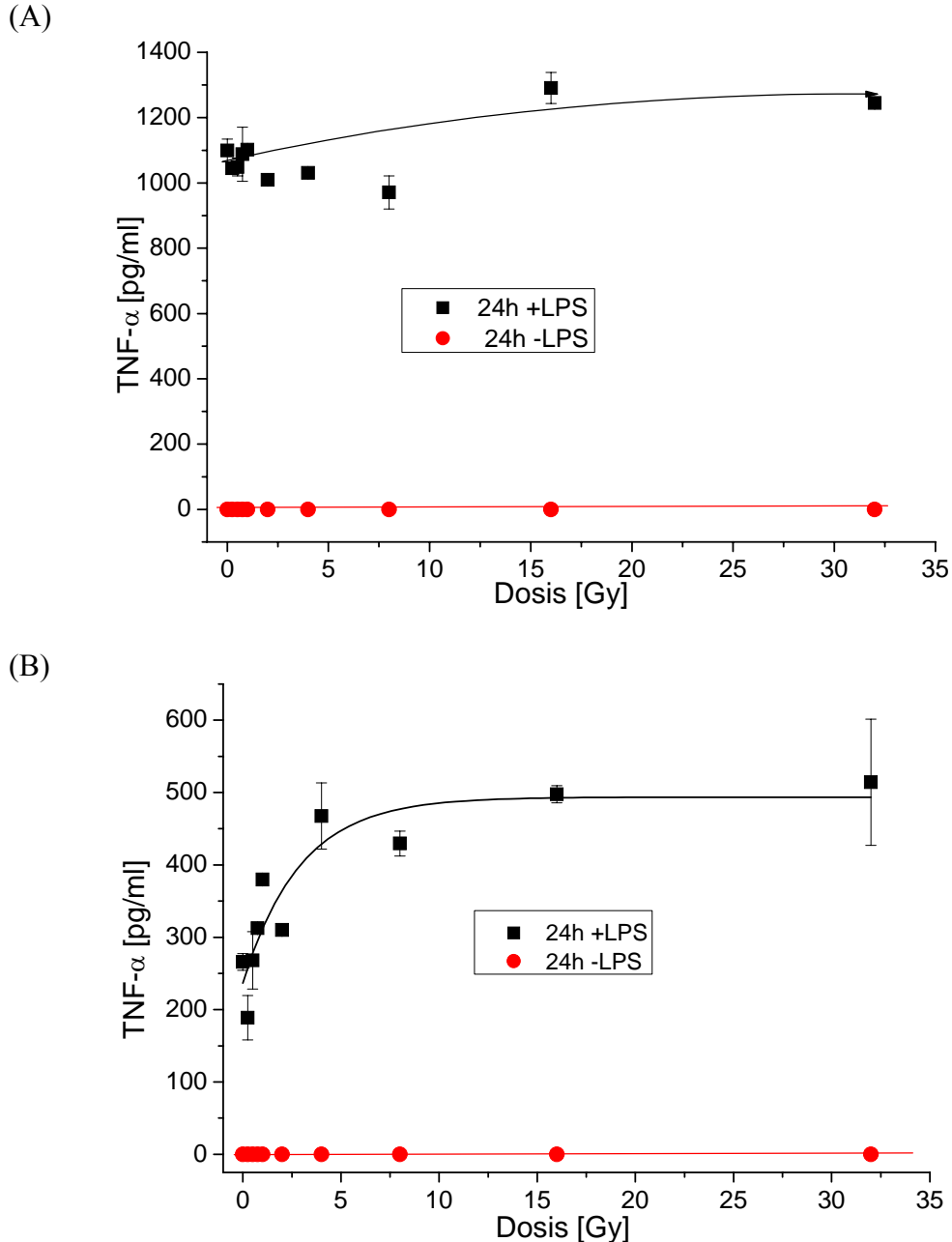


Abb.4.3.5: Einfluss von 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen auf die TNF- α -Produktion humaner Makrophagen. 1×10^6 Zellen wurden mit unterschiedlichen Dosen bestrahlt. Ein Teil der Zellen wurde mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert und die TNF- α Konzentration im Zellkulturüberstand aller Kulturen mit Hilfe eines ELISAs quantifiziert. Die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler zweier unabhängiger Experimente A und B sind dargestellt.

In Experiment A stieg die TNF- α Konzentration den LPS-aktivierten MDM-Kulturen mit steigender Strahlendosis leicht um 11 % von 1100 ± 35 pg/ml auf 1240 ± 20 pg/ml TNF- α an. In Versuch B stieg die sie ebenfalls mit steigender Dosis an, jedoch war der Anstieg stärker, als in Experiment A. Die Menge an produziertem TNF- α lag in Experiment B jedoch deutlich unter der von Experiment A. Unbestrahlte, LPS-aktivierte Makrophagen sezernierten lediglich 265 ± 11 pg/ml

TNF- α . Die Konzentration stieg mit zunehmender Dosis an. Makrophagen, die mit 32 Gy Kohlenstoffionen bestrahlt wurden, wiesen eine TNF- α -Konzentration im Überstand von 515 ± 90 pg/ml TNF- α auf.

In beiden Versuchen produzierten nicht-aktivierte MDM nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen keinerlei TNF- α . Dies war schon der Fall bei murinen Makrophagen, die mit Röntgenstrahlen und Kohlenstoffionen bestrahlt wurden.. Ebenso wurde keinen TNF- α bei humanen MDM nach Röntgenbestrahlung sezerniert (siehe Abb.4.3.1; 4.3.2; 4.3.3 und 4.3.4). Bestrahlung mit niederenergetischen Kohlenstoffionen alleine ist nicht ausreichend, um Makrophagen zu TNF- α -Produktion anzuregen.

4.4 Wirkung ionisierender Strahlen auf die IL-1 β Produktion von Makrophagen

Neben TNF- α gilt IL-1 β als wichtiges proinflammatorisches Zytokin. Murine und humane Makrophagen sind die Hauptproduzenten dieser Zytokine *in vivo*. In inflammatorischen Erkrankungen wie Fibrose oder Pneumonitis, die als Nebenwirkung bei Strahlentherapien vorkommen können, wurde in dem entzündeten Gewebe TNF- α und IL-1 β nachgewiesen (Liu et al., 2006). Um zu untersuchen, wie sich ionisierende Strahlung auf die Produktion von IL-1 β auswirkt, wurden *in vitro* Experimente mit humanen und murinen Makrophagen durchgeführt. IL-1 β wurde in den Zelllysaten gemessen, da dieses Zytokin nicht wie TNF- α durch ausdifferenzierte Makrophagen in die Kulturüberstände sezerniert wird (Wewers & Herzyk, 1989; Schilling et al., 2001). Hierfür wurde ein spezifischer ELISA verwendet und die IL-1 β Menge in Zelllysaten von Makrophagen 24 h nach Ende der Bestrahlung bestimmt.

4.4.1 IL-1 β -Produktion muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen

Als erstes wurde der Einfluss von 250 kV Röntgenstrahlen auf die IL-1 β -Produktion muriner Makrophagen untersucht. Wie in den Experimenten zuvor wurde ein Teil der bestrahlten Zellen zusätzlich mit LPS aktiviert. Das Ergebnis eines repräsentativen Experiments ist in Abbildung 4.4.1 dargestellt.

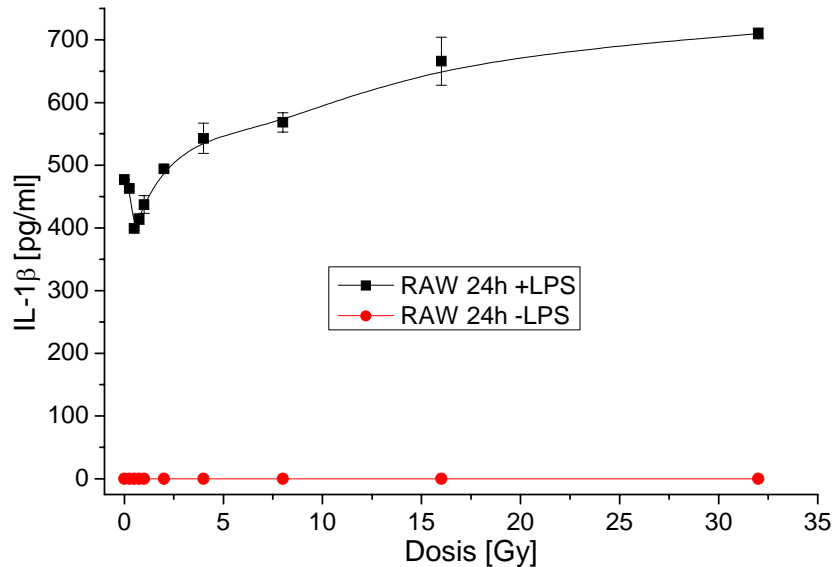


Abb. 4.4.1: Einfluss von Röntgenstrahlen auf die IL-1 β Produktion muriner RAW 264.7 Makrophagen. 1×10^6 Zellen wurden mit unterschiedlichen Dosen 250 kV Röntgenstrahlen bestrahlt. Ein Teil der Zellen wurde direkt im Anschluss an die Bestrahlung mit 1 μ g/ml LPS aktiviert und die IL-1 β Konzentration im Zelllysate der aktivierten bzw. nicht aktivierten Makrophagen 24 h nach Ende der Bestrahlung mit Hilfe eines ELISAs bestimmt. Die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler von 3 parallelen Kulturen sind dargestellt.

Im Zelllysate von unbestrahlten LPS-aktivierten Makrophagen wurden 24 h nach Bestrahlung 490 ± 10 pg/ml IL-1 β gemessen. Im Dosisbereich von 0,25 Gy bis 1 Gy ging die IL-1 β -Konzentration leicht zurück. Makrophagen, die mit 0,5 Gy bestrahlt wurden, produzierten lediglich 400 ± 10 pg/ml. In Makrophagen, die mit Dosen über 1 Gy bestrahlt wurden, kam es zu einem Anstieg in der IL-1 β -Konzentration. Zellen, die mit 32 Gy bestrahlt wurden, enthielten 700 ± 20 pg/ml IL-1 β in den Zelllysaten.

Nicht aktivierte Makrophagen produzierten nach Bestrahlung keinerlei IL-1 β . Bestrahlung alleine war nicht ausreichend, um die IL-1 β -Produktion anzuregen.

4.4.2 IL-1 β -Produktion muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung mit 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen

Neben dem Einfluss von Röntgenstrahlen auf die IL-1 β -Produktion wurde auch der Einfluss von niederenergetischen Kohlenstoffionen auf die Produktion von IL-1 β in murinen Makrophagen untersucht. Die Makrophagen wurden hierfür mit 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen bestrahlt, ein Teil der bestrahlten Zellen mit LPS aktiviert und die IL-1 β Konzentration 24 h nach Ende der Bestrahlung mit Hilfe eines ELISAs bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messung sind in Abbildung 4.4.2 anhand eines repräsentativen Experiments dargestellt.

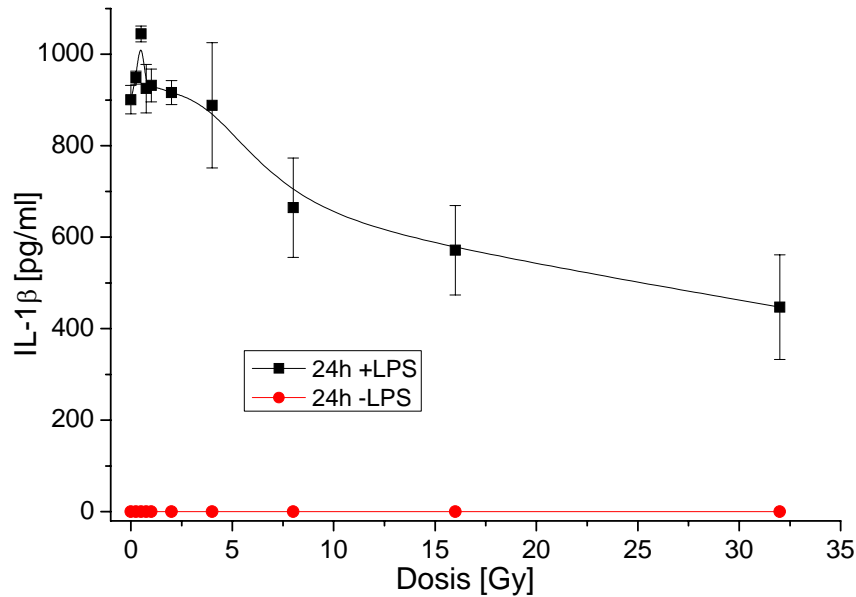


Abb. 4.4.2: Einfluss von niederenergetischen Kohlenstoffionen (9,8 MeV/u; LET=170 keV/μm) auf die IL-1β-Produktion muriner RAW 264.7 Makrophagen. 1×10^6 Zellen wurden mit unterschiedlichen Dosen Kohlenstoffionen bestrahlt. Ein Teil der Makrophagen wurde direkt im Anschluss an die Bestrahlung mit 1 μg/ml LPS aktiviert und die IL-1β-Produktion 24 h nach Ende der Bestrahlung im Zelllysate aller Kulturen mit Hilfe eines ELISAs bestimmt. Die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardabweichung eines repräsentativen Experiments sind dargestellt, es wurden jeweils zwei Kulturen parallel gemessen.

Unbestrahlte, LPS-aktivierte Makrophagen produzierten 900 ± 50 pg/ml IL-1β. Bestrahlung mit Dosen zwischen 0,25 Gy bis 2 Gy hatte keinen Effekt auf die produzierte IL-1β Menge.

Ab einer Dosis von 2 Gy kam es zu einem klaren dosisabhängigen Abfall der IL-1β-Produktion in den LPS-aktivierten Makrophagen. Zellen, die mit 32 Gy Kohlenstoffionen bestrahlt wurden, enthielten 490 ± 170 pg/ml IL-1β. Die Abnahme betrug somit 46 % im Vergleich von unbestrahlten und 32 Gy bestrahlten LPS-aktivierten Makrophagen.

Nicht-aktivierte Makrophagen entwickelten keine messbaren Mengen an IL-1β über den gesamten Dosisbereich hinweg. Die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen alleine war nicht ausreichend um Makrophagen zur Produktion von IL-1β anzuregen. Dies konnte schon bei der Bestimmung der TNF-α-Produktion muriner Makrophagen gezeigt werden (siehe Abb. 4.3.1 bis 4.3.5).

4.4.3 IL-1β Produktion humaner Makrophagen nach Bestrahlung mit 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen

Die Bestimmung der IL-1β-Konzentration erfolgte mit humanen Makrophagen, die *in vitro* aus humanen Monozyten differenziert wurden, da frisch isolierte humane Monozyten sehr wenig Zytokine produzieren. Die Differenzierung erfolgte ohne Zugabe von stimulierenden Zytokinen. Die Messung von IL-1β wurde zunächst in den Kulturüberständen und in den Zelllysaten vorgenommen. Keine messbaren Mengen IL-1β wurden in den Kulturüberständen gefunden. Berichtet wurde die IL-

IL-1 β -Konzentration in den Zelllysaten. Die Ergebnisse zweier Experimente sind in Abbildung 4.4.3 dargestellt.

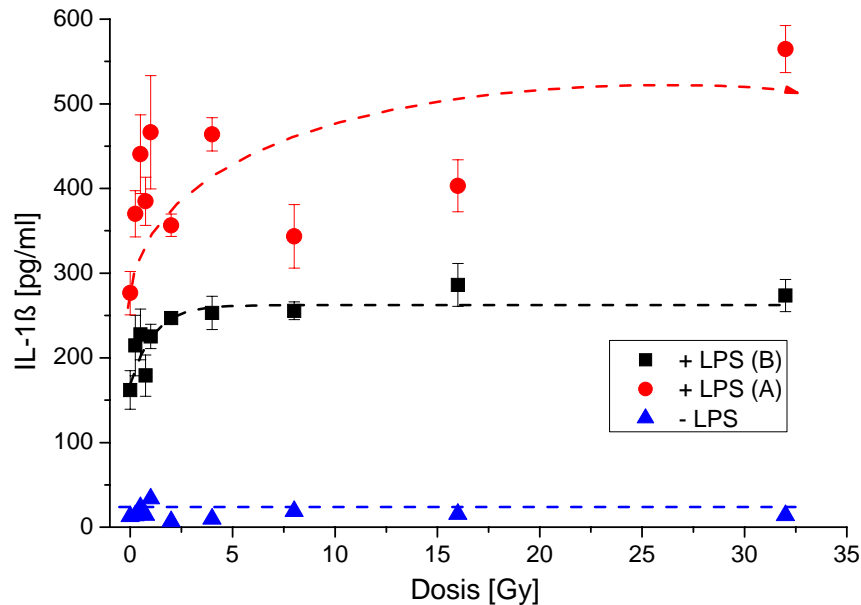


Abb. 4.4.3: Einfluss von niederenergetischen Kohlenstoffionen (9,8 MeV/u) auf die IL-1 β -Produktion humaner Makrophagen. 1×10^6 primäre humane Monozyten wurden ausgesät und für 7 Tage in vitro in Makrophagen differenziert. Anschließend erfolgte die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen. Ein Teil der Zellen wurde mit 1 μ g/ml LPS stimuliert. Die Messung der IL-1 β Konzentration im Zelllysate aller Kulturen erfolgte 24 h nach Ende der Bestrahlung mit Hilfe eines ELISAs. Die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experiments sind dargestellt. Es wurden 4 Kulturen parallel gemessen.

Unbestrahlte, LPS-aktivierte, humane Makrophagen produzierten 280 ± 20 pg/ml bis 370 ± 30 pg/ml IL-1 β . Die Gesamtmenge an produzierten humanen IL-1 β lag somit deutlich unter der von murinen LPS-aktivierten Makrophagen. Nach Bestrahlung konnte eine erhöhte IL-1 β -Konzentration im Zelllysate gemessen werden. Die gemessenen Werte streuten jedoch stark, vor allem in Dosisbereich zwischen 0,25 Gy und 2 Gy.

Nicht-aktivierte, humane Makrophagen produzierten nach Bestrahlung keine messbaren Mengen an IL-1 β . Die Bestrahlung mit niederenergetischen Kohlenstoffionen alleine war nicht ausreichend, um sie zu einer IL-1 β -Produktion anzuregen.

4.5 Einfluss ionisierender Strahlung auf die Stickstoff-Monoxid Produktion muriner RAW 264.7 Makrophagen

Stickstoffmonoxid (NO) wird von Makrophagen nach Aktivierung sezerniert. NO besitzt antimikrobielle Eigenschaften und dient gleichzeitig als Botenstoff und inflammatorischer Mediator. In hohen Konzentrationen induziert NO Apoptose und Nekrosen in entzündlichen Geweben (Tarr et al., 2006).

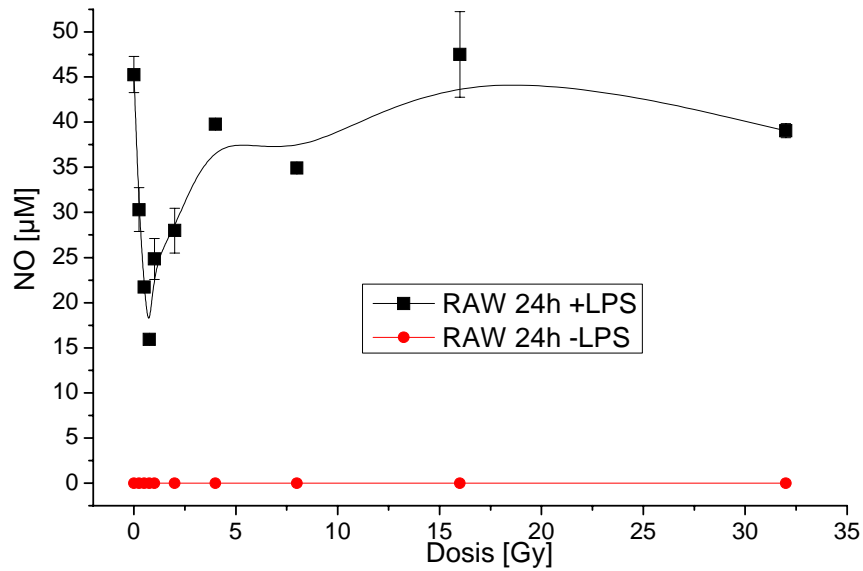
Um den Einfluss von ionisierender Strahlung auf die NO-Produktion in Makrophagen zu untersuchen, wurde die NO-Konzentration in bestrahlten und unbestrahlten Makrophagen mit Hilfe des Griess-Tests 24 h nach Ende der Bestrahlung bestimmt (siehe Kapitel 3.13). Die NO-Konzentration wurde indirekt über die Nitritkonzentration bestimmt, da NO in Gegenwart von Sauerstoff sehr schnell zu Nitrit oxidiert.

4.5.1 Stickstoff-Monoxid-Produktion muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen

Nicht-aktivierte sowie LPS-aktivierte RAW 264.7 Makrophagen wurden mit unterschiedlichen Dosen Röntgenstrahlen behandelt und die produzierte Menge an Stickstoff-Monoxid bestimmt. Die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente sind in Abbildung 4.5.1 (A) und (B) dargestellt.

Nicht-aktivierte Makrophagen produzierten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen keine messbaren Mengen an NO. Bestrahlung mit locker ionisierender Strahlung alleine war nicht ausreichend, um murine Makrophagen zur NO Produktion anzuregen. Nicht-bestrahlte, LPS-aktivierte Makrophagen produzierten zwischen $45 \pm 5 \mu\text{M}$ NO (Versuch A) und $44 \pm 1 \mu\text{M}$ (Versuch B). Nach Bestrahlung mit Dosen zwischen 0,25 Gy und 2 Gy kam es zu einem Abfall der NO-Konzentration. In Versuch A sank die NO-Konzentration bis auf $16 \mu\text{M}$ NO in Zellen, die mit 0,75 Gy bestrahlt wurden. Der Abfall war in Versuch B nicht so stark ausgeprägt, die NO Konzentration sank dort auf $33 \pm 4 \mu\text{M}$ in den Zellen, die mit 1 Gy bestrahlt wurden. Wurden die LPS-aktivierten Makrophagen mit Dosen über 2 Gy bestrahlt stieg die NO-Konzentration wieder an und erreichte wieder das Niveau von unbestrahlten LPS-aktivierten Makrophagen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Bestrahlung von Makrophagen mit Röntgenstrahlen in Dosisbereich von 0,25 Gy bis etwa 1 Gy einen Abfall der NO-Konzentration zur Folge hat. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Hildebrandt et al. (1998) überein.

(A)



(B)

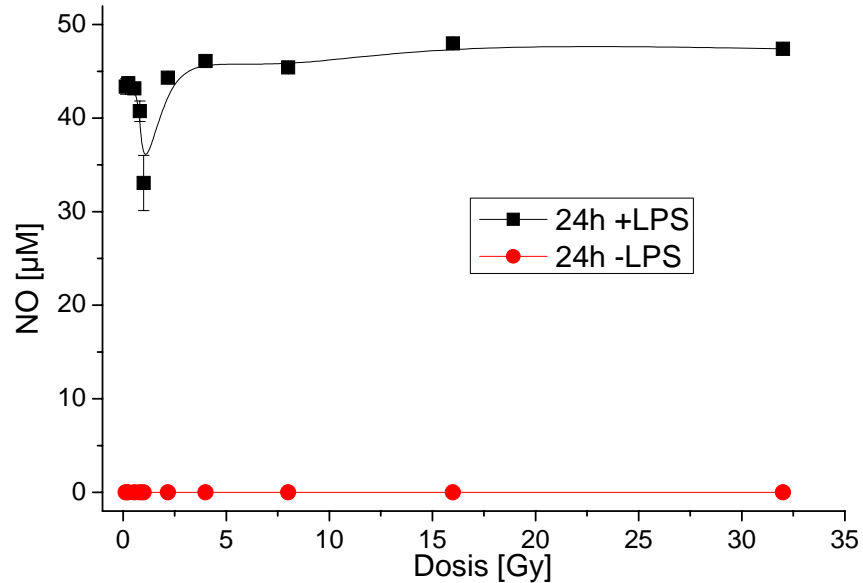


Abb. 4.5.1: Einfluss von 250 kV Röntgenstrahlen auf die Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion muriner RAW 264.7 Makrophagen. 1×10^6 Zellen wurden mit unterschiedlichen Dosen Röntgenstrahlen bestrahlt, ein Teil der Makrophagen direkt im Anschluss an die Bestrahlung mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS aktiviert und die NO-Konzentration 24 h nach Ende der Bestrahlung in allen Kulturen mit Hilfe eines modifizierten Griess-Reagenz bestimmt. Die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler zweier unabhängiger Experimente A und B sind dargestellt. Es wurden jeweils 2 bzw. 4 Kulturen pro Experiment parallel gemessen.

4.5.2 Stickstoff-Monoxid-Produktion muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung mit 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen

Der Einfluss von niederenergetischen Kohlenstoffionen auf die NO-Produktion von murinen RAW 264.7 Makrophagen wurde 24h nach Ende der Bestrahlung bestimmt. Die Ergebnisse zweier unabhängiger Versuche sind in Abbildung 4.5.2 (A) und (B) dargestellt.

Die NO-Konzentration im Überstand von unbestrahlten LPS-aktivierten Makrophagen nach 24 h betrug zwischen 10 μ M und 27 μ M. Nach Bestrahlung stieg die NO-Konzentration in den Überständen der LPS-aktivierten Makrophagen dosisabhängig stark an. In Versuch A stieg die NO-Konzentration in Überstand der unbestrahlten Kontrolle von 10 μ M auf 130 ± 5 μ M NO im Überstand der mit 32 Gy Kohlenstoffionen bestrahlten Makrophagen an. Die NO-Konzentration erreichte schon bei einer Dosis von 8 Gy ein Plateau. In Versuch B stieg die NO-Konzentration von 27 μ M der Kontrolle auf 140 ± 8 μ M nach Bestrahlung mit 32 Gy C-Ionen, jedoch konnte kein Sättigungseffekt nach Bestrahlung mit Dosen über 8 Gy beobachtet werden.

In allen Versuchen konnte kein NO in den Überständen von unstimulierten Makrophagen gemessen werden. Bestrahlung mit Kohlenstoffionen alleine war nicht ausreichend, um die Makrophagen zur Produktion von NO anzuregen. Es zeigte sich jedoch, dass Kohlenstoffionen sehr effektiv die NO-Produktion aktivierter Makrophagen verstärken konnte. Dies konnte nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen nicht beobachtet werden (siehe Abb. 4.5.1).

Es ist nicht möglich, NO-Produktion in humanen Makrophagen direkt zu messen, da im Gegensatz zu murinen Makrophagen induzierbares NO nicht durch LPS induzierbar ist, und humane Makrophagen sehr wenig NO *in vitro* konstitutiv produzieren (Förstermann & Kleinert, 1995; Kleinert et al., 2004). Auf jeden Fall konnte in der vorliegenden Arbeit keine nachweisbare Mengen von NO in humanen Makrophagen *in vitro* nach Bestrahlung nachgewiesen werden, auch nicht nach LPS-Aktivierung.

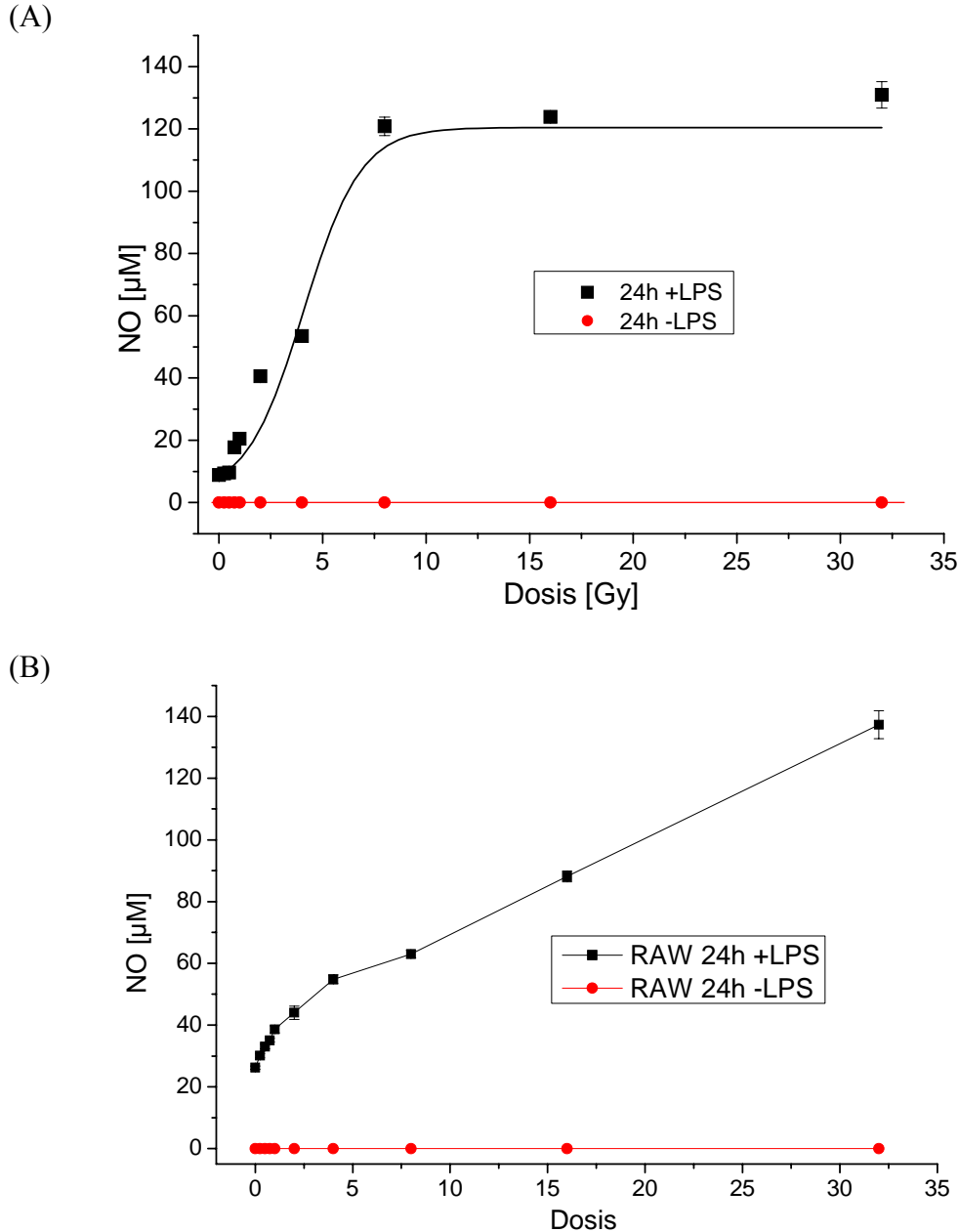


Abb. 4.5.2: Einfluss von niederenergetischen Kohlenstoffionen (9,8 MeV/u) auf die Stickstoffmonoxid-(NO)-Produktion muriner RAW 264.7 Makrophagen. 1×10^6 Zellen wurden mit unterschiedlichen Dosen Kohlenstoffionen bestrahlt. Ein Teil der Makrophagen wurde direkt im Anschluss an die Bestrahlung mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS aktiviert und die NO-Konzentration 24 h nach Ende der Bestrahlung mit Hilfe eines modifizierten Griess-Reagenz in allen Kulturen bestimmt. In den Experimenten A und B (zwei unabhängige Versuche) sind die Daten von jeweils 4 parallelen Proben als arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt.

4.6 Phagozytische Aktivität humaner und muriner Makrophagen nach Bestrahlung

Die Phagozytose ist neben der Produktion von inflammatorischen Mediatoren wie Zytokinen und Stickstoffmonoxid eine der Hauptaufgaben von Makrophagen in biologischen Systemen. Mittels Phagozytose werden beispielsweise anorganische Fremdpartikel wie Staubteilchen und Ruß aus der Lunge entfernt, ebenso wie Bakterien, Pilze und Antikörper-markierte Viren und andere Partikel aus dem Blut bzw. Gewebe. Weiterhin sorgen Makrophagen für die phagozytische Beseitigung von apoptotischen Zellen. Der Einfluss ionisierender Strahlung auf die phagozytische Aktivität humaner und muriner Makrophagen wurde mit Hilfe von internalisierten Latex-Kügelchen untersucht (siehe Abschnitt 3.15).

4.6.1 Phagozytische Aktivität muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen

Die phagozytische Aktivität muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen wurde 24 h nach Ende der Bestrahlung bestimmt. Das Ergebnis eines repräsentativen Experiments ist in Abbildung 4.6.1 dargestellt.

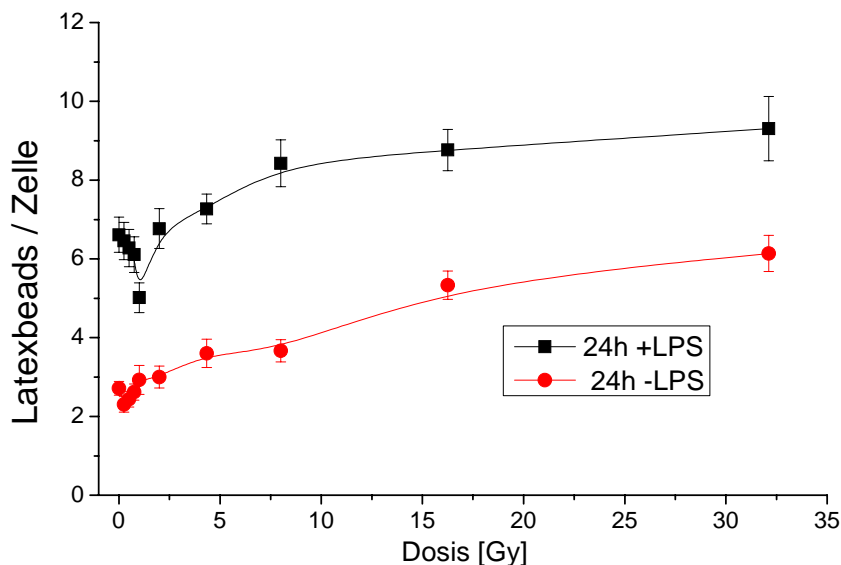


Abb. 4.6.1: Einfluss von 250 kV Röntgenstrahlen auf die phagozytische Aktivität muriner RAW 264.7 Makrophagen. 1×10^6 Zellen wurden mit unterschiedlichen Dosen Röntgenstrahlen bestrahlt und ein Teil der Makrophagen direkt im Anschluss an die Bestrahlung mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS aktiviert. Nach 24 h Kultivierung der Zellen wurden Latex-Beads im Verhältnis 100:1 (Beads zu Zellen) zu den Makrophagen gegeben. Die Zellen wurden anschließend 1 h im Brutschrank belassen, um den Makrophagen die Möglichkeit zu geben, die Latex-Beads zu phagozytieren. Anschließend wurden ungebundene/nicht phagozytierte Beads durch mehrmaliges Waschen entfernt und die Zellen fixiert. Die Auswertung der phagozytischen Aktivität erfolgte durch Bestimmung der phagozytierten Beads in mindestens 500 Zellen. Die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments \pm Standardfehler ($n=500$) sind dargestellt.

Nicht-aktivierte, unbestrahlte Makrophagen internalisierten im Durchschnitt 2,9 Latex-Beads pro Zelle. Die Aktivierung mit LPS erhöhte somit die phagozytische Aktivität, es wurden im Durchschnitt 6,8 Latex-Beads pro Zelle aufgenommen. LPS-aktivierte Makrophagen zeigten eine dosisabhängige Erniedrigung in ihrer phagozytischen Aktivität nach Bestrahlung mit Dosen zwischen 0,25 und 1 Gy. Bestrahlung mit Dosen über 1 Gy erhöhte die phagozytische Aktivität wieder, sie stieg dosisabhängig auf einen Wert von etwa 9 phagozytierten Latex-Beads pro Zelle nach Bestrahlung mit 32 Gy an.

Nicht-aktivierte Makrophagen zeigten einen leichten Abfall ihrer phagozytischen Aktivität im Dosisbereich von 0,25 bis 1 Gy. Nach Bestrahlung mit Dosen über 1 Gy erhöhte sich die phagozytische Aktivität dosisabhängig und stieg auf etwa 6 phagozytierten Latex-Beads pro Zelle nach Bestrahlung mit 32 Gy.

Sowohl LPS-aktivierte als auch nicht-aktivierte Makrophagen zeigten somit eine leichte Erhöhung in ihrer phagozytischen Aktivität nach Bestrahlung mit Dosen über 1 Gy Röntgenstrahlen. Der Abfall der phagozytischen Aktivität nicht-stimulierter Makrophagen im Dosisbereich von 0,25 bis 1 Gy war nicht signifikant (T-Test).

4.6.2 Phagozytische Aktivität muriner RAW 264.7 Makrophagen nach Bestrahlung mit 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen

Die Bestimmung der phagozytischen Aktivität muriner RAW 264.7 Makrophagen erfolgte wieder 24 h nach Ende der Bestrahlung mit niederenergetischen Kohlenstoffionen. Das Ergebnis eines Experiments ist in Abbildung 4.6.2 dargestellt.

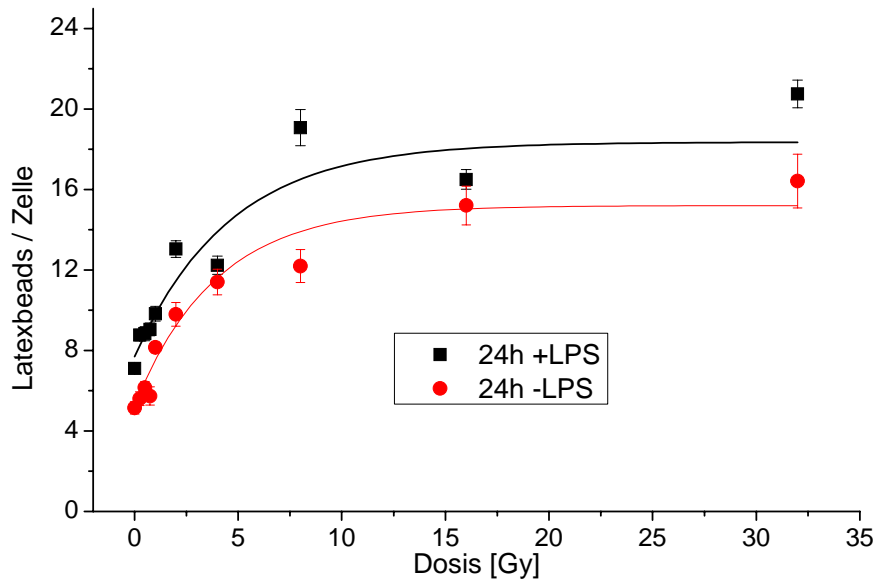


Abb. 4.6.2: Einfluss von niederenergetischen Kohlenstoffionen (9,8 MeV/u) auf die phagozytische Aktivität muriner RAW 264.7 Makrophagen. 1×10^6 Zellen wurden mit unterschiedlichen Dosen Kohlenstoffionen bestrahlt und ein Teil der Makrophagen direkt im Anschluss an die Bestrahlung mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS aktiviert. Nach 24 h Kultivierung der Zellen wurden Latex-Beads im Verhältnis 100:1 (Beads zu Zellen) zu den Makrophagen gegeben. Die Zellen wurde anschließend 1 h im Brutschrank belassen, um den Makrophagen die Möglichkeit zu geben, die Latex-Beads zu phagozytieren. Anschließend wurden ungebundene/nicht phagozytierte Beads durch mehrmaliges Waschen entfernt und die Zellen fixiert. Die Auswertung der phagozytischen Aktivität erfolgte durch Bestimmung der phagozytierten Beads in mindestens 500 Zellen. Die Ergebnisse eines Experiments \pm Standardfehler (n=500) sind dargestellt.

LPS-aktivierte, nicht-bestrahlte Makrophagen wiesen im Durchschnitt 7 phagozytierte Latex-Beads pro Zelle auf, nicht-aktivierte, unbestrahlte Makrophagen im Durchschnitt 4,5 Latex-Beads. In den LPS-aktivierten Makrophagen kam es nach Bestrahlung zu einer deutlichen dosisabhängigen Steigerung der phagozytischen Aktivität im Dosisbereich zwischen 0,25 Gy und 8 Gy. Nach Bestrahlung mit 8 Gy Kohlenstoffionen wurden durchschnittlich 19 Latex-Beads pro Zelle phagozytiert. Bestrahlung mit Dosen über 8 Gy erbrachte keine weitere deutliche Steigerung der phagozytischen Aktivität. LPS-aktivierte Makrophagen, die mit 32 Gy bestrahlt wurden, phagozytierten im Durchschnitt 21 Beads pro Zelle.

Nicht-aktivierte Makrophagen zeigten wie die LPS-aktivierten Makrophagen einen linearen dosisabhängigen Anstieg ihrer phagozytischen Aktivität im Dosisbereich von 0,25 Gy bis 8 Gy. Nach Bestrahlung mit 8 Gy Kohlenstoffionen wiesen die nicht-aktivierten Makrophagen eine durchschnittliche Anzahl von 12 internalisierten Beads pro Zelle auf. Eine Erhöhung der applizierten Dosis von 8 Gy auf 16 bzw. 32 Gy erbrachte nur eine leichte Steigerung der phagozytischen Aktivität. Nach Bestrahlung mit 32 Gy Kohlenstoffionen wurden durchschnittlich 16 Latex-Beads von den Makrophagen phagozytiert.

Festzuhalten ist, dass Bestrahlung mit niederenergetischen Kohlenstoffionen in Vergleich zu Bestrahlung mit Röntgenstrahlen die phagozytische Aktivität von LPS-aktivierten und nicht-aktivierten Makrophagen deutlich stärker steigern kann. Bestrahlung mit 32 Gy Röntgenstrahlen steigerte die phagozytischen Aktivität LPS-aktivierter Makrophagen um 61 % im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Im Gegensatz dazu steigerte sich die phagozytische Aktivität LPS-aktivierter Makrophagen nach Bestrahlung mit 32 Gy Kohlenstoffionen um 300 %. Dieser deutliche Effekt zeigte sich auch bei nicht-aktivierten Makrophagen. Nach Bestrahlung mit 32 Gy Röntgenstrahlen steigerte sich die phagozytische Aktivität um 105 %, nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen steigerte sie sich um 355 %.

4.6.3 Phagozytische Aktivität humaner Makrophagen nach Bestrahlung mit 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen

Der Effekt von niederenergetischen Kohlenstoffstrahlen auf die phagozytische Aktivität humaner Makrophagen erfolgte mit primären Blutmonozyten, die *in vitro* für 7 Tage in Makrophagen differenziert wurden. Die Bestimmung der phagozytischen Aktivität erfolgte wieder 24 h nach Ende der Bestrahlung. Das Ergebnis einer repräsentativen Messung ist in Abbildung 4.6.3 dargestellt.

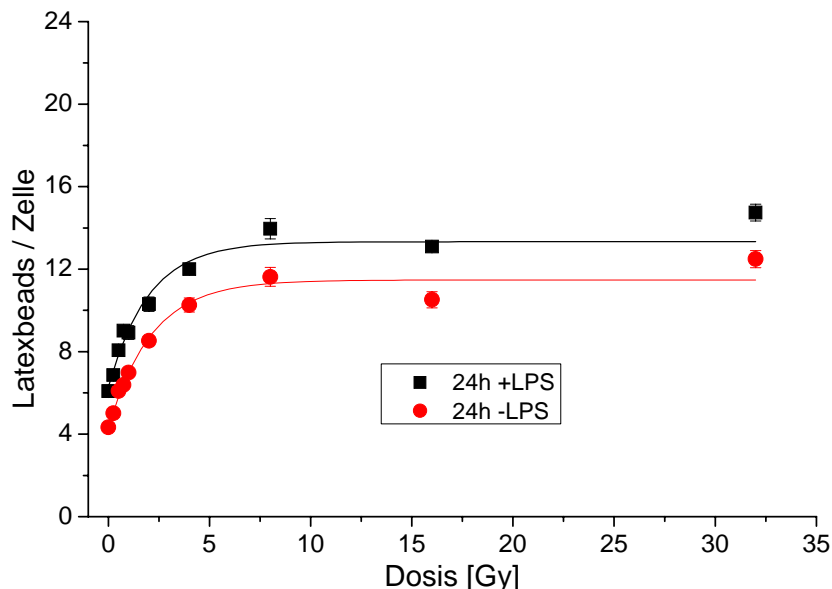


Abb. 4.6.3: Einfluss von niederenergetischen Kohlenstoffionen (9,8 MeV/u) auf die phagozytische Aktivität humaner Makrophagen. 1×10^6 primäre humane Monozyten wurden ausgesät und für 7 Tage *in vitro* in Makrophagen differenziert. Anschließend erfolgte die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen. Ein Teil der Makrophagen wurde mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert. Nach 24 h Kultivierung der Zellen wurden Latex-Beads im Verhältnis 100:1 (Beads zu Zellen) zu den Makrophagen gegeben. Die Zellen wurde anschließend 1 h im Brutschrank belassen um den Makrophagen die Möglichkeit zu geben die Latex-Beads zu phagozytieren. Anschließend wurden ungebundene/nicht phagozytierte Beads durch mehrmaliges Waschen entfernt und die Zellen fixiert. Die Auswertung der phagozytischen Aktivität erfolgte durch Auszählung der phagozytierten Beads pro Zelle in mindestens 500 Zellen. Die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments \pm Standardfehler ($n=500$) sind dargestellt.

Die LPS-aktivierten, humanen MDM zeigten wie die murinen Makrophagen einen deutlichen dosisabhängigen Anstieg ihrer phagozytischen Aktivität im Dosisbereich von 0,25 Gy bis 4 Gy. Nicht bestrahlte, humane Makrophagen internalisierten durchschnittlich 6 Latex-Beads pro Zelle. Nach Bestrahlung mit 4 Gy wurden im Durchschnitt 12 Latex-Beads pro Zelle gezählt, nach Dosen über 4 Gy erhöhte die phagozytische Aktivität nur noch leicht. Bei einer Dosis von 32 Gy phagozytierten sie etwa 15 Latex-Beads pro Zelle.

Nicht-aktivierte, humane MDM zeigten wie die LPS-aktivierten Zellen einen deutlichen dosisabhängigen Anstieg ihrer phagozytischen Aktivität im Dosisbereich zwischen 0,25 Gy bis 4 Gy. Unbestrahlte, nicht-aktivierte Zellen phagozytierten durchschnittlich 4 Beads pro Zelle. Nach Bestrahlung mit 4 Gy Kohlenstoffionen stieg die Anzahl phagozytierter Beads auf etwa 10 Beads pro Zelle an. Nach Dosen über 4 Gy steigerte sich die phagozytische Aktivität nur noch geringfügig weiter. Zellen, die mit 32 Gy Kohlenstoffionen bestrahlt wurden, internalisierten 12 Beads pro Zelle. Die Anzahl an internalisierten Beads in LPS-aktivierten humanen Makrophagen lag immer höher als die Anzahl an internalisierten Beads in unstimulierten Makrophagen.

Im Vergleich mit den murinen RAW 264.7 Makrophagen ist die phagozytische Aktivität *in vitro* differenzierte humane Makrophagen geringfügig niedriger. Die allgemeine Strahlenantwort beider Zellarten ist jedoch vergleichbar.

Festzuhalten ist, dass sowohl murine als auch humane Makrophagen eine deutliche dosisabhängige Steigerung ihrer phagozytischen Aktivität aufweisen, wenn sie mit niederenergetischen Kohlenstoffionen bestrahlt wurden.

4.7 Strahlensensitivität primärer humaner B-Lymphozyten

Über die allgemeine Strahlensensitivität primärer humaner B-Lymphozyten im Vergleich zu T-Lymphozyten existieren zurzeit nur wenige Informationen. Daten zu chromosomalen Aberrationsraten in humanen T-Lymphozyten nach Hoch-LET-Bestrahlung zeigen, dass Lymphozyten, die 72 h bzw. 96 h nach Ende der Bestrahlung untersucht wurden, eine höhere Aberrationsrate aufweisen als Lymphozyten, die nach 48 h untersucht wurden. Als Ursachen für die erhöhte Aberrationsrate wurden verstärkte Zellzyklus-Verzögerungen diskutiert, hervorgerufen durch die Hoch-LET-Bestrahlung. Als eine andere mögliche Ursache dieser erhöhten Aberrationsrate wurde die unterschiedliche Strahlensensitivität der verschiedenen Lymphozyten-Subpopulationen, besonders die der B-Lymphozyten, diskutiert (Hoffmann et al., 2002; Hone et al., 2005). Um zu überprüfen, ob die beobachtete erhöhte Aberrationsrate in Lymphozytenkulturen nach Hoch-LET-Bestrahlung auf der erhöhten Strahlensensitivität primärer humaner B-Lymphozyten beruht, wurde deren Strahlensensitivität auf der Ebene chromosomaler Aberrationen nach Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen und 100 MeV/u Kohlenstoffionen [LET=29 keV/μm] untersucht.

4.7.1 Isolierung von B-Lymphozyten mit Schafserythrozyten nach Bestrahlung und Stimulierung

Die Isolierung der B-Lymphozyten nach Bestrahlung einer gemischten T- und B-Lymphozytenkultur erfolgte mit Schafserythrozyten wie ausführlich in Abschnitt 3.5 beschrieben. Nach der Bestrahlung und Stimulierung mit Pokeweed-Mitogen (PWA) wurde die Lymphozytenkultur für 72 h bzw. 96 h im Brutschrank inkubiert und 3 h vor Ende der Stimulierungszeit Colcemid zugegeben um Mitosen anzureichern. Die anschließende Isolierung der B-Lymphozyten und Plasmazellen mit Schafserythrozyten dauerte zwischen 3 h und 4 h. Anschließend wurde die Reinheit der erhaltenen B-Lymphozytensuspension mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper durchflußzytometrisch bestimmt. Als B-Zell-Marker wurden Anti-CD19-PE und Anti-CD38-FITC-Antikörper verwendet. Der CD38-FITC-Antikörper diente der Erkennung von terminal differenzierten Plasmazellen, CD19-PE für alle naiven B-Zellen. Der CD-3-FITC diente zur Erkennung aller T-Zellen.

Das Ergebnis einer solchen Reinheitsbestimmung ist in Abbildung 4.7.1 gezeigt.

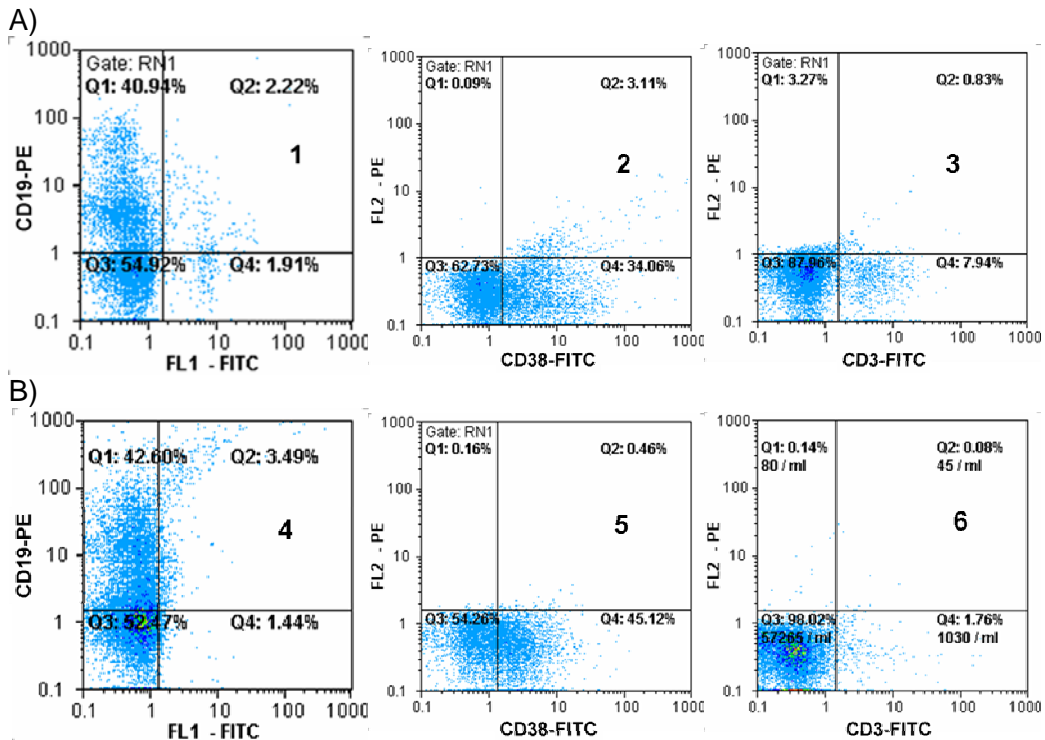


Abb. 4.7.1: Durchflußzytometrische Bestimmung der Zellpopulationsverteilung nach Depletierung von T-Lymphozyten. Zwei unabhängige Experimente A) und B) sind dargestellt. Die Zellen in Versuch A wurden nach 72 h geerntet, in Versuch B betrug die Kultivierungszeit 96 h. Verwendet wurden Anti-CD19-PE (Diagramm 1 und 4), Anti-CD38-FITC (Diagramm 2 und 5) und Anti-CD3-FITC Antikörper (Diagramm 3 und 6). Es wurden jeweils mindestens 1×10^6 Zellen gefärbt. In Quadrant Q1 von Diagramm 1 und 4 ist der Anteil an CD19-positiven B-Lymphozyten zu sehen und in Quadrant Q4 von Diagramm 2 und 5 ist der Anteil an CD38-positiven Plasmazellen. In Quadrant Q4 von Diagramm 3 und 6 ist der jeweilige Anteil an CD3-positiven T-Lymphozyten dargestellt.

Der Anteil an B-Lymphozyten in Experiment A lag bei insgesamt 75 %. Der Anteil von CD19 positiven B-Lymphozyten betrug 41 %, der Anteil an CD38 positiven Plasmazellen 34 %. Die Färbung mit CD3-FITC-Antikörpern zeigte, dass nach der Reinigung noch ca. 8 % T-Lymphozyten in der Kultur vorhanden waren. Insgesamt konnten in diesem Experiment 17 % der aufgereinigten Zellpopulation nicht mit den verwendeten Antikörpern gefärbt werden. Sehr wahrscheinlich handelte es dabei um CD2 negative NK-Zellen. Die meisten NK-Zellen tragen den CD2-Rezeptor und werden somit während der T-Zell-Rosettierung ebenfalls entfernt, nur CD2 negative NK-Zellen bleiben zusammen mit den B-Lymphozyten nach der Reinigung erhalten.

In Versuch B liegt der Anteil an B-Lymphocyten bei ca. 88 %, wobei 43 % auf CD19 positive B-Lymphocyten und 45 % auf CD38 positive Plasmazellen entfielen. Der Anteil an T-Lymphocyten lag bei unter 2 %. Auch in diesem Versuch konnten ein Teil der Zellpopulation nicht mit den verwendeten Antikörpern gefärbt werden. Weiterhin ist zu sehen, dass in Versuch B mehr Plasmazellen gefunden wurden, als in Versuch A. Da die Zellpopulation in Versuch B 96 h stimuliert wurde und nicht wie in Versuch A für 72 h war eine Zunahme an Plasmazellen zu erwarten.

4.7.2 Chromosomenschäden in primären human B-Lymphozyten nach Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen

Die Bestrahlung, Stimulierung und Isolierung der humanen B-Lymphocyten erfolgte wie in Kapitel 3.8, 3.4 und 3.6 beschrieben. Die Stimulierungsdauer betrug 72 h oder 96 h. Die Auswertung erfolgte mit FPG-gefärbten Chromosomenpräparaten und beschränkte sich auf Zellen, die sich in der ersten Metaphase nach Bestrahlung befanden. Die Herstellung der Präparate erfolgte durch den Author dieser Arbeit, die Auswertung erfolgte durch Elena Nasonova (JINR, Dubna). Als Vergleichswerte wurden Chromosomenanalysen PHA-stimulierter PBL-Kulturen aus der Arbeitsgruppe Ritter (Biophysik, GSI) hinzugezogen. Diese Chromosomenanalysen wurden mit nicht getrennten peripheren Blutlymphocyten erstellt. Es ist trotzdem davon auszugehen, dass bei diesen Analysen hauptsächlich T-Lymphocyten erfasst wurden, da B-Lymphocyten lediglich ~8-10% der peripheren Blutlymphocyten darstellen. Somit können sie als Vergleich mit der Art und Häufigkeit von Chromosomenschäden in B-Lymphocyten benutzt.

Die Ergebnisse der Chromosomenanalyse humaner B-Lymphocyten im Vergleich mit Daten aus der Arbeitsgruppe Ritter (bezeichnet mit „T-Lymphocyten“) sind in Abbildung 4.7.2 (A) und (B) dargestellt.

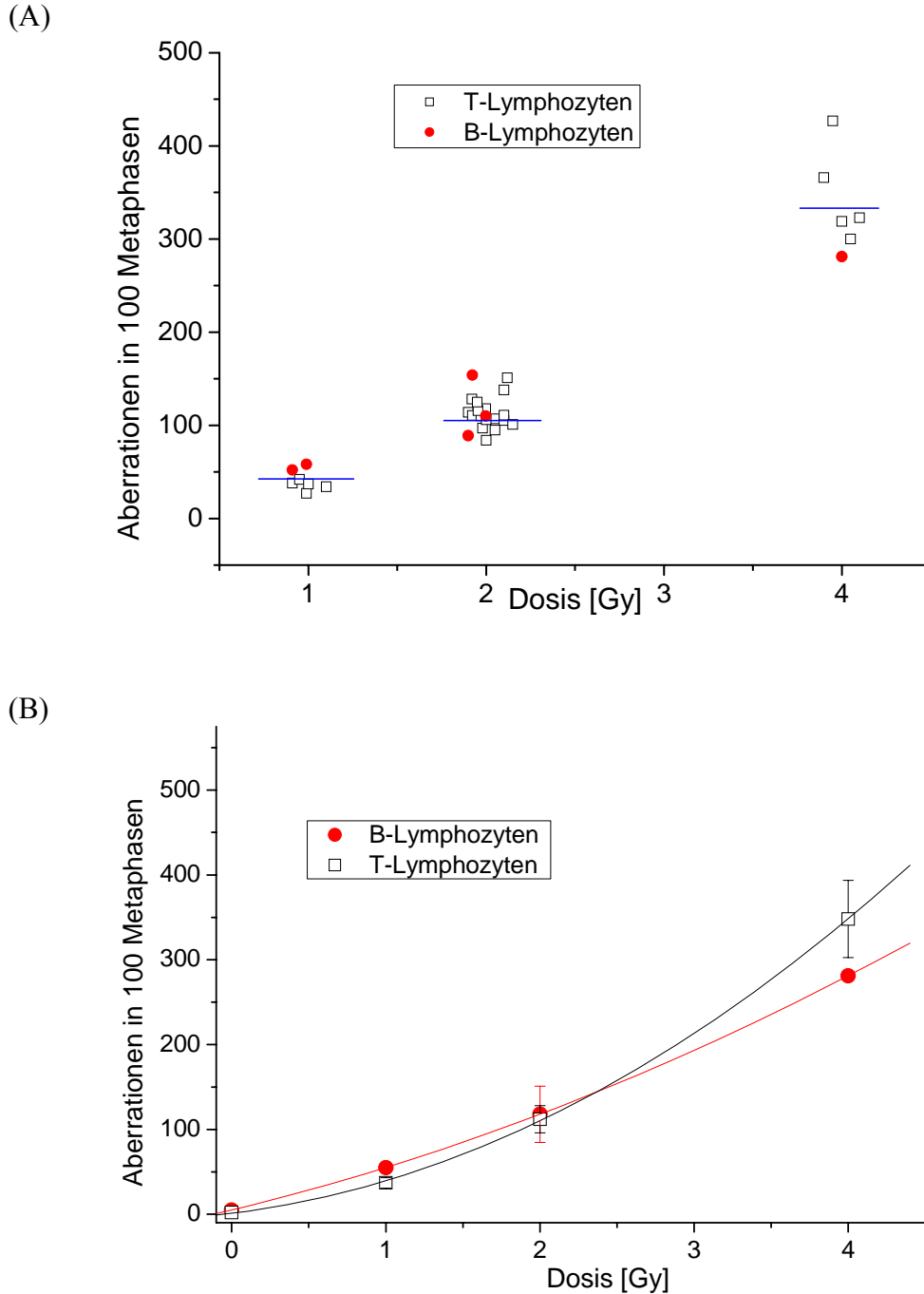


Abb. 4.7.2 (A): Scatter-Plot-Darstellung der Chromosomenanalyse humaner B-Lymphozyten und T-Lymphozyten. Analysiert wurden Zellen, die sich in der ersten Metaphase nach Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen befanden. Die Stimulierungsdauer betrug 72 h bzw. 96 h. Aufgetragen sind die Aberration pro 100 Metaphasen gegen die applizierte Dosis. Die Mittelwerte der Aberrationsrate pro jeweiligen Dosispunkt sind mit einer blauen Linie gekennzeichnet. In Abbildung (B) sind die Ergebnisse der Chromosomenanalyse zusammengefasst dargestellt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Wie in den Abbildungen zu sehen ist, unterscheidet sich die chromosomale Aberrationsrate von B-Lymphozyten nicht signifikant im Vergleich zu T-Lymphozyten nach Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen. Die Aberrationsrate der unbestrahlten Kontrolle von B-Lymphozyten betrug 4,8 Aberrationen in 100 Metaphasen, in unbestrahlte T-Lymphozyten lag der Wert bei 3.

Nach Bestrahlung mit 1 Gy lag die Aberrationsrate von B-Lymphozyten bei durchschnittlich 55 Schäden pro 100 Metaphasen, T-Lymphozyten wiesen durchschnittlich 37 Chromosomenschäden pro 100 Metaphasen auf. Nach Bestrahlung mit 2 Gy lag die durchschnittliche Anzahl 118 in B-Lymphozyten und bei 112 in T-Lymphozyten. Eine Dosis von 4 Gy induzierte 218 Aberrationen in den gemessenen B-Lymphozyten, in T-Lymphozyten lag die durchschnittliche Aberrationsrate bei 348 pro 100 Metaphasen. Eine Auflistung der einzelnen Aberrationstypen für jeden einzelnen Spender, Dosis und Zeitpunkt ist im Anhang, Tabelle 4.7.2 gegeben.

4.7.3 Chromosomenschäden in primären human B-Lymphozyten nach Bestrahlung mit 100 MeV/u Kohlenstoffionen

Um zu überprüfen, ob es Unterschiede in der Art oder Rate von Chromosomenaberrationen in B-Lymphozyten nach Bestrahlung mit dicht ionisierender Strahlung im Vergleich zu T-Lymphozyten gibt, wurden Experimente mit 100 MeV/u Kohlenstoffionen ($LET = 29 \text{ KeV}/\mu\text{m}$) durchgeführt. Die Bestrahlung, Stimulierung und Isolierung erfolgte wie in Abschnitt 3.3.1, 3.4.2 und 3.5 beschrieben. Als Vergleich wurden wieder Daten von der Arbeitsgruppe Ritter verwendet, und werden im Weiteren in den Abbildungen als „T-Lymphozyten“ gekennzeichnet. Wie die Abbildungen 4.7.3 (A) und (B) zeigen, ist auch nach der Bestrahlung mit Kohlenstoffionen kein signifikanter Unterschied in der Art und Rate der Chromosomenschäden von B- und T-Lymphozyten zu erkennen. Nach Bestrahlung 1 Gy Kohlenstoffionen wurden durchschnittlich 137 Aberrationen in 100 Metaphasen in B-Lymphozyten gezählt, in T-Lymphozyten durchschnittlich 110. Die korrespondierenden Werte nach Bestrahlung mit 2 Gy betrugen 261 Aberrationen pro 100 Metaphasen für B-Lymphozyten und 217 Aberrationen in 100 Metaphasen für T-Lymphozyten. Es liegen keine Daten für die Aberrationsrate von B-Lymphozyten vor, die mit 4 Gy bestrahlt wurden. T-Lymphozyten die mit 4 Gy bestrahlt wurden, zeigten eine durchschnittliche Aberrationsrate von 510 Aberrationen in 100 Metaphasezellen.

Die Anzahl an Aberrationen in B-Lymphozyten lag nach Bestrahlung mit 1 Gy und 2 Gy Kohlenstoffionen etwas höher als die Aberrationsrate von T-Lymphozyten, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant (T-Test). Eine Auflistung der einzelnen Aberrationstypen für jeden einzelnen Spender, Dosis und Zeitpunkt ist in Tabelle 4.7.3 gegeben.

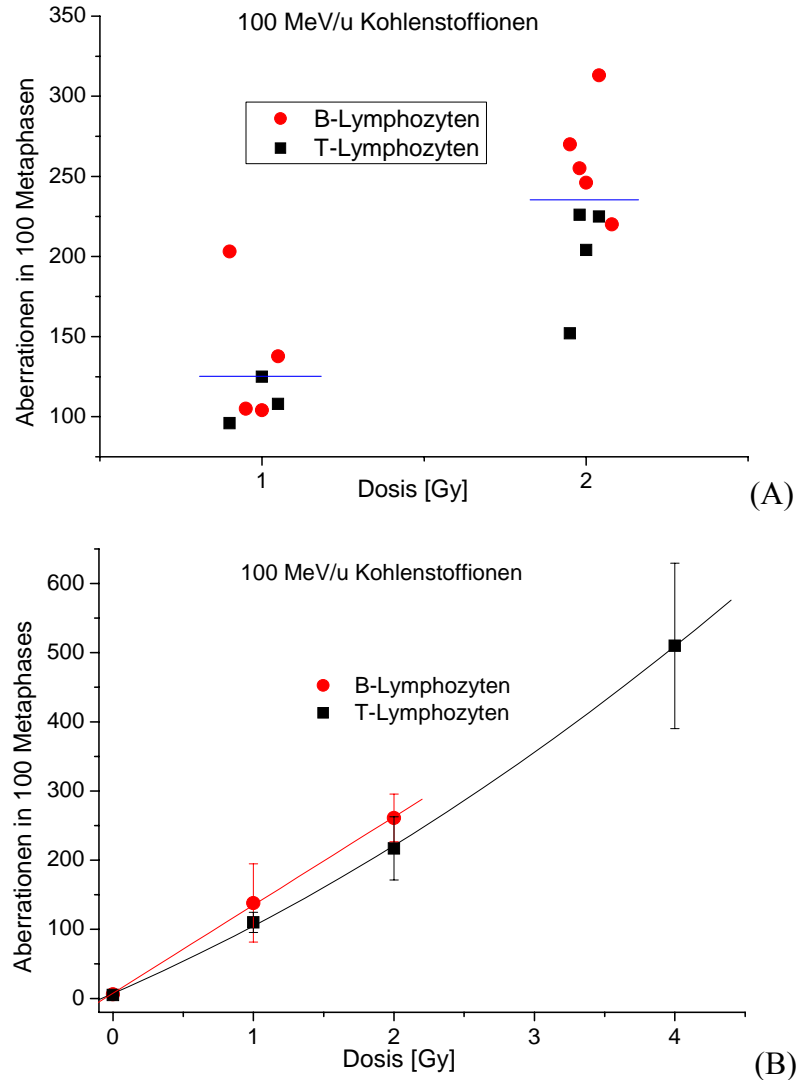


Abb. 4.7.3 (A): Scatter-Plot-Darstellung der Chromosomenanalyse primärer humaner B- und T-Lymphozyten nach Bestrahlung mit 100 MeV/u Kohlenstoffionen. Die Stimulierungsdauer der B-Lymphozyten betrug 72 h bzw. 96 h, analysiert wurden Zellen die sich in der ersten Metaphase nach Bestrahlung befanden. Aufgetragen sind die Aberrationsraten pro 100 Metaphasen gegen die applizierte Dosis. Die arithmetischen Mittelwerte der Aberrationsrate für jede Dosis sind mit einer blauen Linie gekennzeichnet. In Abbildung 4.7.3 (B) sind die Ergebnisse der Chromosomenanalyse zusammengefasst dargestellt. Der Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung der jeweiligen Aberrationsrate für B- und T-Lymphozyten.

4.7.4 Relative Biologische Wirksamkeit (RBW)

Die Relative Biologische Wirksamkeit wurde wie in Kapitel 2.2, Formel 4 beschreiben bestimmt. Die RBW von 100 MeV/u Kohlenstoffionen für die Induktion von 100 bzw. 200 Aberration pro 100 Metaphasezellen in der 1. Mitose nach Bestrahlung wurde anhand der Graphen in Abbildung 4.7.4 berechnet. Auch

hier dienten Daten aus der Arbeitsgruppe Ritter als Vergleichswerte für die T-Lymphozyten.

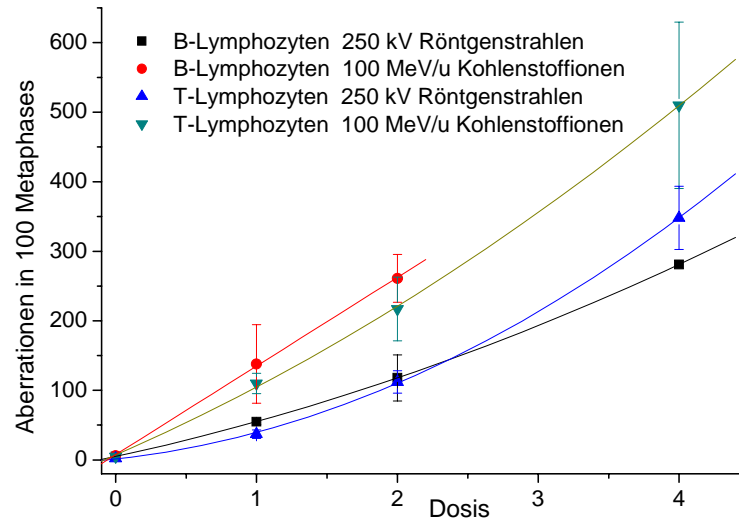


Abb. 4.7.4: Aberrationen in 100 Metaphasen der 1. Mitose nach Bestrahlung mit 100 MeV/u Kohlenstoffionen bzw. 250 kV Röntgenstrahlen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die einzelnen Messpunkte der Röntgenexperimente für B- und T-Lymphozyten und die Kohlenstoffionenexperimente mit T-Lymphozyten konnten mit einer linear-quadratischen Kurve hinreichend genau beschrieben werden. Die Messpunkte der Kohlenstoffionenexperimente mit B-Lymphozyten konnten mit sehr guter Übereinstimmung mit einer linearen Beziehung dargestellt werden, bedingt durch die geringe Anzahl an einzelnen Messpunkten.

Für B-Lymphozyten ergibt sich daraus ein RBW_{100} von 2,5 bzw. ein RBW_{200} von 1,9. Für T-Lymphozyten lag der RBW_{100} bei 2 und für RBW_{200} bei 1,6. Für B-Lymphozyten war der RBW-Wert somit gegenüber T-Lymphozyten leicht erhöht.

4.7.5 Sister-Chromatid-Exchanges (SCE) in humanen B- und T-Lymphozyten

Die Rate der Schwesterchromatidaustausche in humanen B- und T-Lymphozyten wurde in Metaphasen der 2. Mitose nach Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen und 100 MeV/u Kohlenstoffionen bestimmt. Die SCE-Rate unbestrahlter, humaner T-Lymphozyten wurde mit Hilfe von Chromosomenpräparaten bestimmt, die von der Arbeitsgruppe Ritter (GSI, Darmstadt) bei vorhergehenden Experimenten hergestellt wurden. Die SCE-Rate humaner B-Lymphozyten erfolgte mit den für die Chromosomenanalyse erstellten Chromosomenpräparaten, die Daten der bestrahlten T-Lymphozyten mit Hilfe der rosettierten T-Lymphozyten, die nach der Aufreinigung der B-Zellen anfielen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 4.7.5 dargestellt.

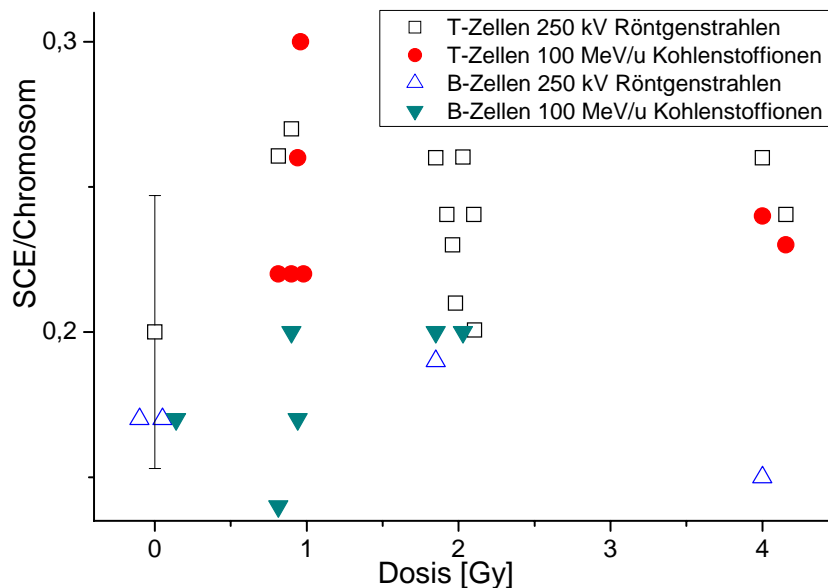


Abb. 4.7.5: Scatter-Plot-Darstellung der Schwesterchromatidaustausche in humanen B- und T-Lymphozyten nach Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen und 100 MeV/u Kohlenstoffionen. Aufgetragen ist die Anzahl an SCEs pro Chromosom gegen die applizierte Dosis. Der Messpunkt mit dem eingezeichneten Fehlerbalken der unbestrahlten Kontrolle für T-Lymphozyten stellt die Standardabweichung von insgesamt 37 unabhängigen Experimenten dar, die in der Arbeitsgruppe Ritter von E. Nasonova erstellt wurden (Daten nicht publiziert). Die SCE-Rate in humanen B-Lymphozyten erfolgte mit Präparaten, die 72 h bzw. 96 h nach Bestrahlung angefertigt wurden. Die in der Graphik gezeigten Messpunkte für die SCE-Rate in humanen T-Lymphozyten umfassen den Zeitraum von 48 h bis 84 h nach Bestrahlung. Da keine zeitabhängige Veränderung in der SCE-Rate von B- und T-Lymphozyten festgestellt werden konnte, wurden alle SCE-Raten der verschiedenen Zeitpunkte zusammengefasst dargestellt.

Wie in Abbildung 4.7.5 zu sehen schwankte die SCE-Rate von T-Lymphozyten in den unbestrahlten Kontrollen erheblich, sie lag bei 0,22 pro Chromosom und stellt den arithmetischen Mittelwert aus insgesamt 37 unabhängige Experimente dar. Der niedrigste Wert in diesen T-Zell-Experimenten lag bei 0,1 SCE pro Chromosom, der Höchste bei 0,35 pro Chromosom.

In B-Lymphozyten wurde jeweils ein Wert von 0,17 bestimmt. T-Lymphozyten, die mit Röntgenstrahlen oder Kohlenstoffionen bestrahlt wurden, zeigten eine leicht erhöhte SCE-Rate. Die SCE-Rate humaner B-Lymphozyten nach Bestrahlung mit 1 Gy 100 MeV/u Kohlenstoffionen schwankte zwischen 0,14 und 0,2 und lag somit im Durchschnitt nicht höher als die unbestrahlte Kontrolle (0,17). Nach Bestrahlung mit 2 Gy Kohlenstoffionen lag die SCE-Rate bei jeweils 0,2 in zwei unabhängigen Experimenten. Die SCE-Rate in humanen B-Lymphozyten nach Bestrahlung mit 1Gy und 2 Gy 100 MeV/u Kohlenstoffionen war nicht erhöht. Nach Bestrahlung mit 2 Gy Röntgenstrahlen stieg die SCE-Rate in B-Lymphozyten leicht von 0,17 auf 0,19 an, nach Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy konnte jedoch nur eine SCE-Rate von 0,15 gemessen werden. Auch nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen konnte keine signifikante Dosisabhängige Veränderung in der SCE-Rate in B-Lymphozyten festgestellt werden.

4.7.6 Stimulierung humaner B- und T-Lymphozyten nach Bestrahlung

Die Stimulierbarkeit von B- und T-Lymphozyten nach Bestrahlung gibt Hinweise auf die Strahlenempfindlichkeit der jeweiligen Lymphozyten Subpopulation. Da in den B-Lymphozyten-Experimenten Pokeweed-Mitogen als Proliferationsstimulanz verwendet wurde, konnten die erhaltenen Daten zur Stimulierbarkeit der B-Lymphozyten nicht mit den vorhandenen Daten von T-Lymphozyten verglichen werden, die in der Arbeitsgruppe Ritter (GSI, Darmstadt) erstellt wurden. Bei diesen Versuchen wurde Phytohämagglutinin als Mitogen eingesetzt. Als Vergleich wurden deshalb die rosettierten T-Lymphozyten, die nach der Aufreinigung der B-Lymphozyten anfielen, verwendet. Der Anteil an stimulierten Zellen in der Population wurde lichtmikroskopisch anhand charakteristischer morphologischer Unterschiede bestimmt (siehe Kapitel 3.11.1). Die Ergebnisse der Bestimmung der Stimulierungsrate sind in Abbildung 4.7.6.

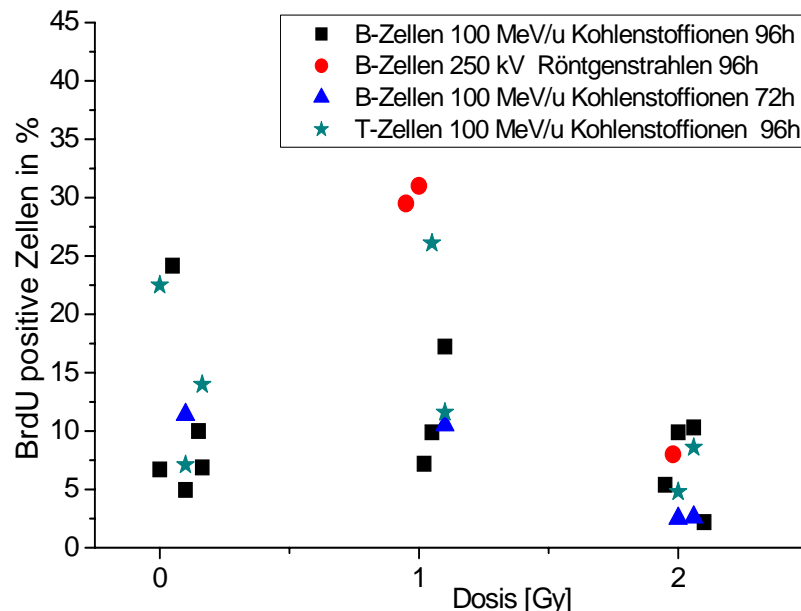


Abb. 4.7.6: Scatter-Plot-Darstellung des Anteils an stimulierten B- und T-Lymphozyten nach Bestrahlung mit 100 MeV/u Kohlenstoffionen oder 250 kV Röntgenstrahlen. Jeder Messpunkt stellt das Ergebnis eines Experiments dar. Aufgetragen ist der prozentuale Anteil an stimulierten Zellen in der Gesamtpopulation gegen die applizierte Dosis nach 72 h und 96 h Stimulation mit Pokeweed-Mitogen (PWA).

In beiden Lymphozyten Subpopulationen war eine Abnahme an stimulierten Zellen nach Bestrahlung mit 100 MeV/u Kohlenstoff mit steigender Dosis zu erkennen. Nach 72 h war die Abnahme der Zellstimulierung in den mit 1 Gy Kohlenstoffionen bestrahlten Kulturen nicht sehr ausgeprägt. Erst bei einer applizierten Dosis von 2 Gy zeigte sich eine deutliche Reduzierung der stimulierten Zellen. Ein ähnliches Ergebnis wurde in den B- und T-Zell-Kulturen 96 h nach Kohlenstoffbestrahlung festgestellt. Auch nach Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlung konnte eine

Reduktion der Stimulierbarkeit in B-Lymphozyten mit steigender Dosis beobachtet werden.

Unbestrahlte Lymphozyten zeigten einen deutlichen Unterschied in ihrer Stimulierbarkeit gegenüber PWA. Je nach Experiment wurden zwischen 5 % und 25 % der unbestrahlten B-Zellen im Untersuchungszeitraum stimuliert. Unbestrahlte T-Zell-Kulturen enthielten zwischen 7 % und 23 % aktivierte Zellen. Es wurde kein Unterschied in der Stimulierbarkeit mit PWA zwischen T-Zellen und B-Zellen festgestellt.

4.7.7 Mitoseindex und Anzahl von Zellen in der 1. Mitose nach Bestrahlung

Der Mitoseindex und die Anzahl von Metaphasen in der 1. Mitose nach Bestrahlung geben Auskunft über die Proliferationsgeschwindigkeit einer Lymphozytenkultur, über deren Zellzyklusverlauf und über eventuell aufgetretene strahleninduzierte Zellzyklusverzögerungen. Nach Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen bzw. 100 MeV/u Kohlenstoffionen und Stimulierung mit PWA wurden der Mitoseindex und die Anzahl an 1. Mitosen in mindestens 2000 Zellen pro Probe bestimmt.

In B- und T-Lymphozyten wurde annähernd der gleiche Mitoseindex gemessen (siehe Anhang, Tabelle 4.7.7). PWA stimuliert somit beide Lymphozyten-Subpopulationen gleich stark. Der Mitoseindex nahm bei beiden Lymphozyten-Arten nach Bestrahlung mit Dosen ≥ 2 Gy Röntgen- oder 100 MeV/u Kohlenstoffionentrahlen ab (Tabelle 4.7.7). Da der Anteil an T-Lymphozyten in den aufgereinigten B-Lymphozyten zwischen 2 % und 8 % betrug (Kapitel 4.7.1), und der Mitoseindex der T- und B-Zell-Kulturen der gleiche war, ist davon auszugehen, dass ebenso 2 % bis 8 % der ausgewerteten Mitosen T-Zell-Mitosen waren.

In Abbildung 4.7.7 sind die prozentualen Anteile an Metaphasen, die sich in der 1. Mitose nach Bestrahlung befanden, dargestellt.

Wie in Abbildung 4.7.7 zu sehen, gibt es eine sehr große Variabilität hinsichtlich der Anzahl an Metaphasen in der 1. Mitose nach Bestrahlung und Stimulierung der B-Lymphozyten mit PWA. Unbestrahlte Kontrollen wiesen nach 96 h Kultivierung zwischen 35 % und 81 % Metaphasen in der 1. Mitose auf. Auch nach 72 h Kultivierung wurden zwischen 36 % und 77 % 1. Mitosen in den Präparaten gefunden. Mit Ausnahme des in Abbildung 4.7.7. mit roten Punkten dargestellten Experiments konnte kein klarer Dosis- oder zeitabhängiger Trend in der Anzahl an 1. Mitosen in B-Lymphozyten festgestellt werden.

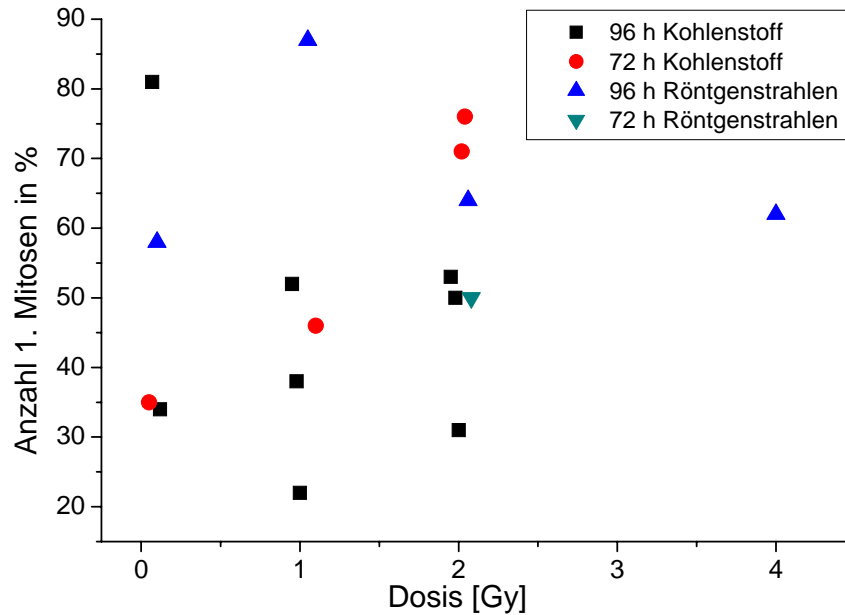


Abb. 4.7.7: Scatter-Plot-Darstellung der Anzahl der Metaphasen in der 1. Mitose der primären, humanen B-Lymphozyten nach Bestrahlung mit 100 MeV/u Kohlenstoffionen oder 250 kV Röntgenstrahlen und Stimulierung mit PWA.

4.7.8 Verteilung der Lymphozyten-Subpopulationen nach Bestrahlung

Um zu überprüfen, wie sich die einzelnen Lymphozyten-Subpopulationen nach Bestrahlung und Stimulierung mit PWA in Kultur entwickeln, wurde der Anteil an CD3 positiven T-Lymphozyten, CD14 positiven Monozyten, CD19 positiven B-Lymphozyten und CD56 positiven NK-Zellen durchflußzytometrisch zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen und 100 MeV/u Kohlenstoffionen bestimmt. Es erfolgte keine Trennung von B- und T-Lymphozyten bei diesem Versuch, weiterhin wurden die Monozyten vor der Bestrahlung und Stimulierung nicht entfernt. Insgesamt konnten jeweils ca. 91% der bestrahlten bzw. unbestrahlten Kulturen mit den vier verwendeten Antikörpern erfasst werden. In diesen Versuchen konnte kein CD38 Antikörper gegen Plasmazellen eingesetzt werden, da aktivierte T-Lymphozyten in der Lage sind in geringem Umfang CD38 zu exprimieren, und diese somit nicht klar von CD38 positiven Plasmazellen zu unterscheiden gewesen wären. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.7.8 dargestellt.

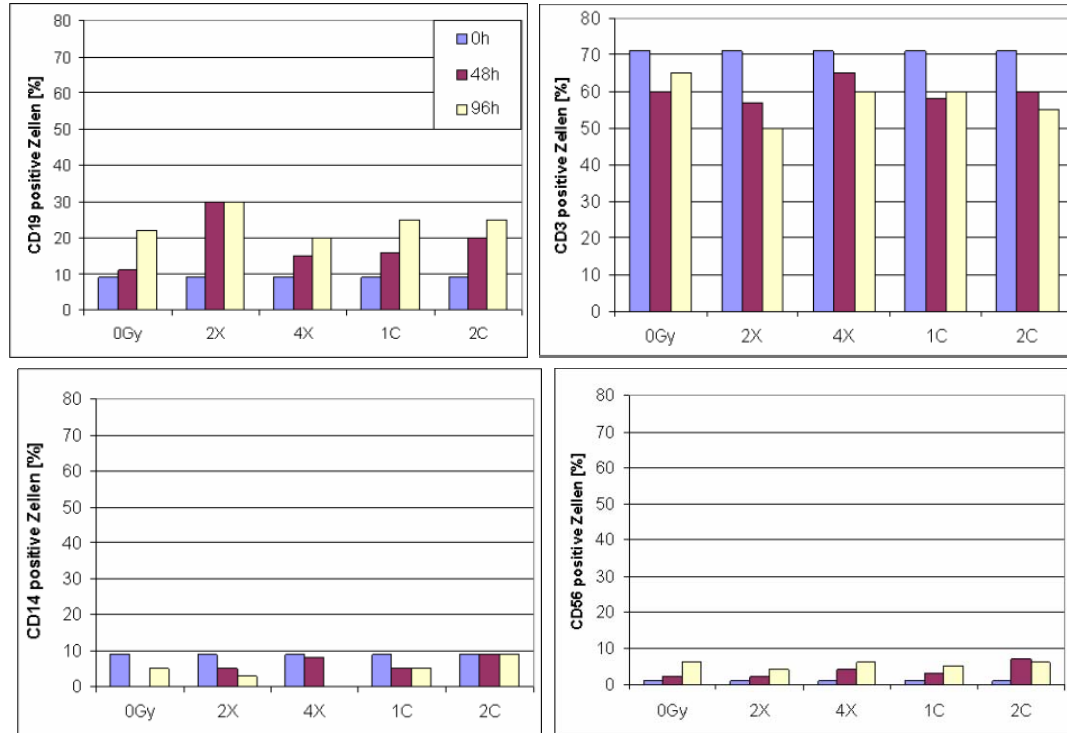


Abb. 4.7.8: Durchflußzytometrische Bestimmung der Anteile der jeweiligen Lymphozyten-Subpopulation an der PWA-stimulierten Lymphozytenkultur. Die Zellen wurden mit 2 Gy und 4 Gy 250 kV Röntgenstrahlen (2X und 4X), sowie 1 Gy und 2 Gy 100 MeV/u Kohlenstoffionen (1C und 2C) bestrahlt. Dargestellt sind die prozentualen Anteile von T-Lymphozyten (CD3 positiv), Monozyten (CD14 positiv), B-Lymphozyten (CD19 positiv) und NK-Zellen (CD56 positiv) zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 48 h und 96 h).

Zu Beginn der Kultivierung betrug der Anteil an T-Lymphozyten 71 %, B-Lymphozyten 9 %, Monozyten 9 % und NK-Zellen 2 %. Insgesamt konnten 9 % der Kultur nicht mit den verwendeten Antikörpern gefärbt werden. Der Anteil an T-Lymphozyten sank mit zunehmender Stimulierungsdauer, unabhängig davon ob diese bestrahlt wurden oder nicht.

Es konnte kein ausgeprägter Dosisseffekt in der Verteilung der B- und T-Lymphozyten nach Bestrahlung festgestellt werden, jedoch ein ausgeprägter Zeiteffekt. Parallel zu der beobachteten Abnahme an T-Zellen nahm die Anzahl an B-Zellen mit steigender Kultivierungszeit zu. Der Anteil an Makrophagen blieb in dem untersuchten Zeitraum weitestgehend konstant, die Anzahl an NK-Zellen stieg hingegen leicht an. Es konnte wieder kein signifikanter dosisabhängiger Effekt in der Entwicklung der Monozyten- oder NK-Zell-Population beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass deutliche Änderungen in der Zusammensetzung der Lymphozyten-Subpopulationen nur bei dem Anteil von B- und T-Lymphozyten beobachtet wurden.

4.7.9 Apoptoserate humaner B- und T-Lymphozyten nach Bestrahlung

Um zu überprüfen, ob sich die Apoptoserate von humanen B-Lymphozyten und T-Lymphozyten unterscheidet, wurde der Anteil an apoptotischen B- und T-Zellen in den aufgereinigten Lymphozytenkulturen nach Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen oder 100 MeV/u Kohlenstoffionen und Stimulierung mit PWA bestimmt. Hierfür wurden direkt im Anschluss an die B-Zell-Aufreinigung 1×10^6 B-Zellen und 1×10^6 rosettierte T-Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und mit 10 µg/ml Acridin-Orange und 1 µg/ml Hoechst 33342 gefärbt (siehe Abschnitt 3.17). Der Anteil an apoptotischen Zellen wurde anhand der charakteristischen Kernmorphologie apoptotischer Zellen ermittelt. Das Ergebnis der Apoptoseratebestimmung mit zwei verschiedenen Spendern ist in Abbildung 4.7.9 gezeigt.

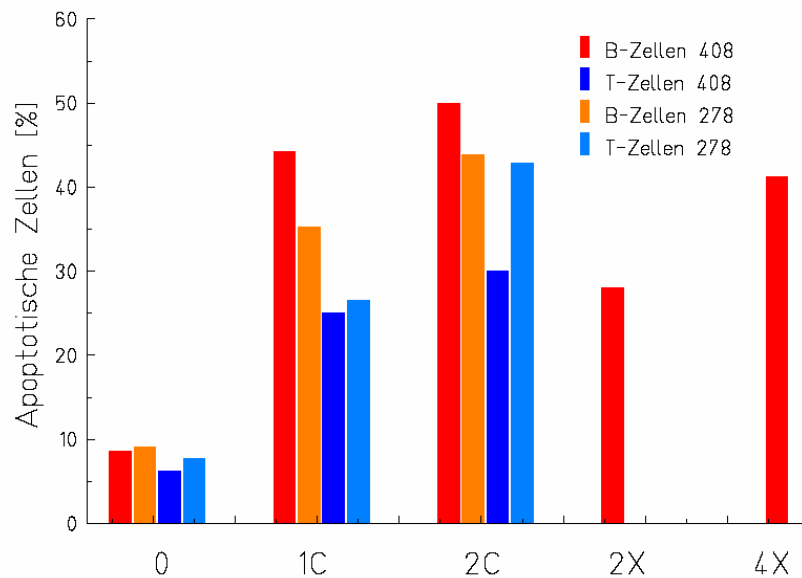


Abb. 4.7.9: Anteil apoptotischer Zellen in PWA-stimulierten, aufgereinigten B- und T-Lymphozytenkulturen. T- und B-Zell-Kulturen zweier Spender (Spender 408 und 278) wurden mit 2Gy und 4 Gy 250 kV Röntgenstrahlen (2X bzw. 4X) und 1 Gy bzw. 2 Gy 100 MeV/u Kohlenstoffionen (1C bzw. 2C) bestrahlt und dem Kulturmedium 1 µg/ml PWA zugesetzt. Nach 96 h erfolgte die Isolierung der B-Zellen und T-Zellen. Jeweils 1×10^6 B-Zellen und T-Zellen des jeweiligen Spenders wurden anschließend mit 4% Paraformaldehyd fixiert und der Anteil an apoptotischen Zellen in den getrennten Kulturen lichtmikroskopisch bestimmt. Es wurden mindestens 500 Zellen ausgewertet.

Der Anteil an apoptotischen B- und T-Zellen nahm nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen und Kohlenstoffionen stark zu. In B-Lymphozyten von Spender 408 wurden in der unbestrahlten Kontrolle ~9 % apoptotische Zellen erfasst. Nach Bestrahlung mit 1 Gy bzw. 2 Gy 100 MeV/u Kohlenstoffionen stieg der Wert auf 44,2 % bzw. 50%. Auch die Bestrahlung mit 2 Gy bzw. 4 Gy 250 kV Röntgenstrahlen konnte einer Erhöhung der Apoptoserate auf 28 % bzw. 41,3 % festgestellt werden. In den isolierten T-Lymphozyten des Spenders 408 stieg die Apoptoserate von 6,2 % in der unbestrahlten Kultur auf 25 % bzw. 30 % nach

Bestrahlung mit Kohlenstoffionen. Die Apoptoserate von B-Zellen war somit gegenüber der Apoptoserate von T-Zellen erhöht.

Bei Spender 278 betrug der Anteil apoptotischer B- und T-Zellen in der unbestrahlten Kontrolle bei 9,1 % bzw. 7,7 %. Nach Bestrahlung mit 1 Gy Kohlenstoffionen stieg die Apoptoserate auf 35,2 % in der B-Zell-Kultur und auf 26,6 % in der T-Zell-Kultur. In den mit 2 Gy Kohlenstoffionen bestrahlten Kulturen lag die Apoptoserate bei 43,9 % für B-Zellen und bei 42,9 % für T-Zellen. Der Unterschied in der Apoptoserate von B- und T-Zellen des Spenders 278 war nicht so deutlich ausgeprägt wie dies bei Spender 408 der Fall war.

4.7.10 Entwicklung von B-Lymphozyten in Phytohämagglutinin-stimulierten Lymphozytenkulturen

Für die Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit humaner B-Lymphozyten wurde das T-Zell abhängige B-Zell Mitogen Pokeweed-Mitogen (PWA) verwendet (siehe Kapitel 3.4.1). Um zu überprüfen, wie sich B-Lymphozyten in einer Kultur verhalten, die mit Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert wurden, wurden frisch isolierte Lymphozyten mit 1 % PHA stimuliert und der Anteil an B-Lymphozyten mittels CD19-PE Antikörperfärbung zu verschiedenen Zeitpunkten lichtmikroskopisch bestimmt. Weiterhin wurde der Anteil an mitotischen B-Lymphozyten in den Kulturen ermittelt. In Abbildung 4.7.10 ist das Ergebnis der Bestimmung des B-Zell Anteils in einer PHA-stimulierten Lymphozytenkultur dargestellt.

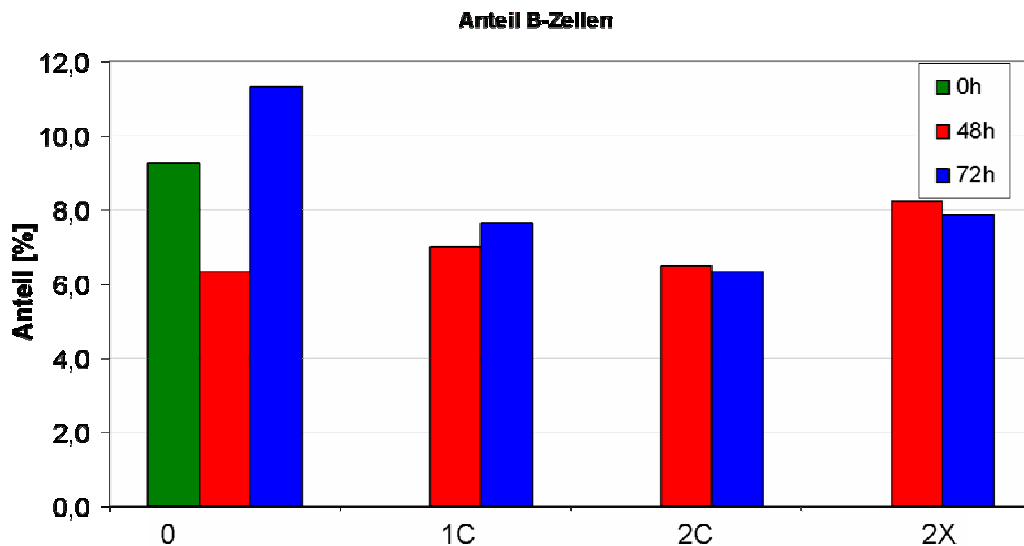


Abb. 4.7.10: Anteil an CD19-PE positiven B-Lymphozyten in einer PHA-stimulierten Lymphozytenkultur eines gesunden weiblichen Spenders. Die Stimulierung mit PHA erfolgte direkt im Anschluss an die Bestrahlung mit 2 Gy 250 kV Röntgenstrahlen (X2) bzw. 1 Gy und 2 Gy 100 MeV/u Kohlenstoffionen (C1, C2). Der Anteil an B-Zellen wurde nach 48 h bzw. 72 h lichtmikroskopisch bestimmt. Es wurden mindestens 1500 Zellen ausgewertet.

Wie in Abbildung 4.7.10 zu sehen ist, nahm der Anteil an B-Lymphozyten in der unbestrahlten Kontrolle mit steigender Kultivierungszeit anfänglich etwas ab. Ausgehend von 9 % B-Lymphozyten in der Kultur zum Zeitpunkt 0 h, fiel der Anteil auf ca. 6,2 % nach 48 h Kultivierung in Gegenwart von PHA. Nach 72 h konnten ca. 11 % der Zellen als CD19 positive B-Lymphozyten identifiziert werden.

Die Bestrahlung mit 1 Gy 100 MeV/u Kohlenstoffionen oder 250 kV Röntgenstrahlen hatte keinen signifikanten Einfluss auf den prozentualen Anteil an B-Zellen in der Kultur über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg. Dies bedeutet, dass bei klassischen zytogenetischen Untersuchungen mit peripheren Blutlymphozyten ein nicht unerheblicher Anteil der verwendeten Zellen B-Lymphozyten sind.

Um zu überprüfen, ob die B-Zellen in den bestrahlten und mit PHA stimulierten Kulturen proliferieren, und somit B-Zell-Mitosen bei Chromosomenanalysen mit erfasst werden, wurde der Anteil mitotischer B-Lymphozyten in der PHA-stimulierten und bestrahlten Kultur untersucht. Das Ergebnisse der B-Zell-Mitosebestimmung sind in Abbildung 4.7.11 (A) und (B) dargestellt.

(A)

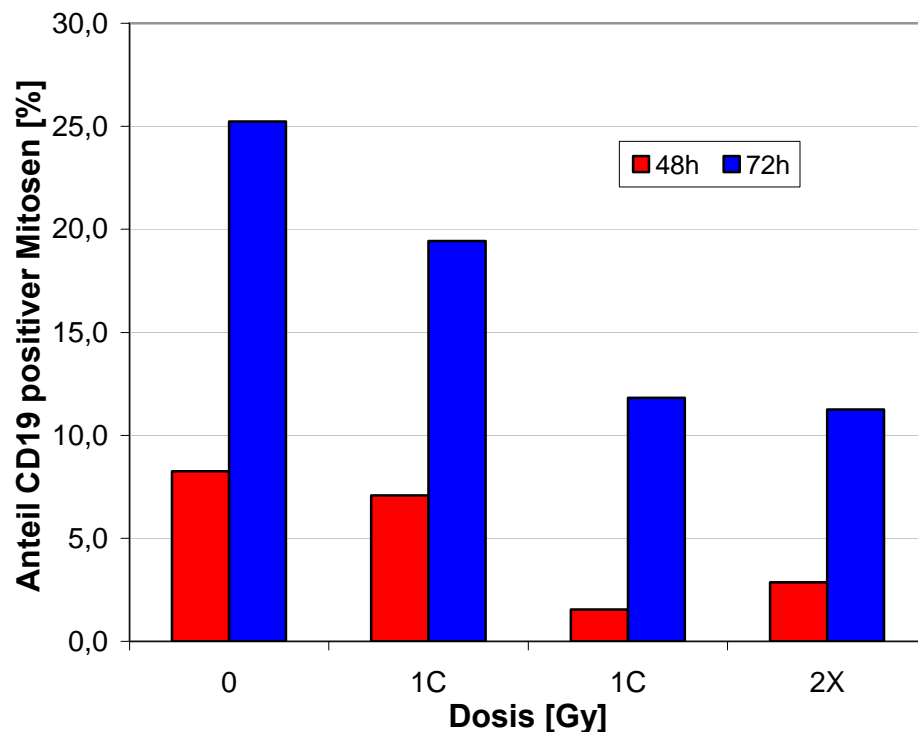


Abb. 4.7.11 (A): B-Zell-Mitosen in einer PHA-stimulierten Lymphozytenkultur. Die Lymphozyten wurden mit 1 Gy und 2 Gy 100 MeV/u Kohlenstoffionen bestrahlt (C1, C2) bzw. mit 2 Gy 250 kV Röntgenstrahlen. Direkt im Anschluss an die Bestrahlung erfolgte die Stimulierung mit 1 % PHA. 3 h vor Ablauf der jeweiligen Stimulierungszeit wurde Colcemid zugegeben, um Metaphasen anzureichern. Anschließend erfolgte die Färbung mit CD19-PE-Antikörpern und 0,2µg/ml DAPI. Mindestens 100 Metaphasen wurden Fluoreszenzlichtmikroskopisch ausgewertet.

(B)

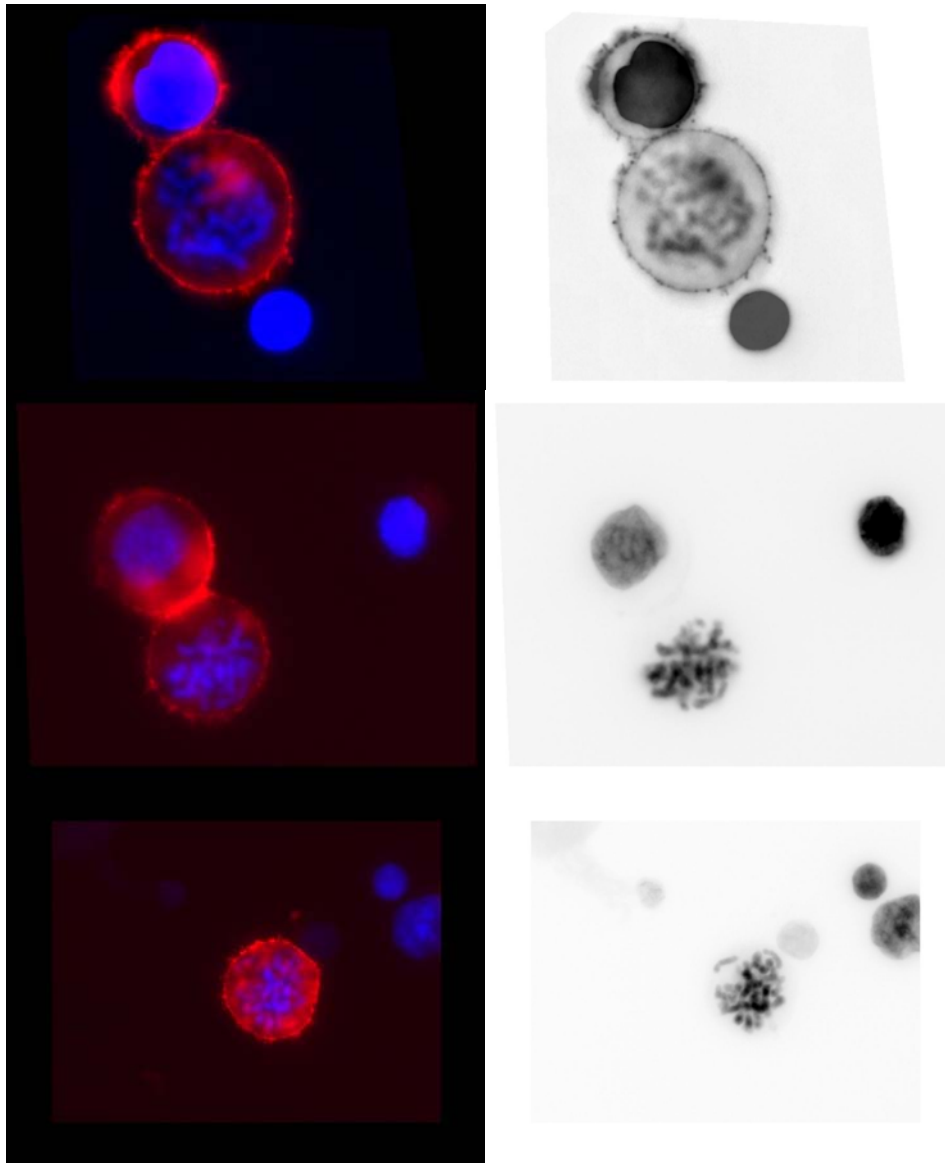


Abb. 4.7.11 (B): Darstellung der B-Zellen bzw. B-Zell-Mitosen. Auf der linken Seite sind CD19-PE markierte B-Zellen bzw. B-Zell-Mitosen zu sehen. In rot ist die CD19-PE markierte Zellmembran von B-Zellen zu erkennen. Die Zellkerne bzw. die Chromosomen innerhalb der Zelle sind blau eingefärbt. Auf der rechten Seite sind die Bilder invertiert dargestellt.

Wie in Abbildung 4.7.11 (A) zu sehen ist, steigt der Anteil an B-Zell-Mitosen mit zunehmender Kultivierungszeit stark an. Bestrahlung mit 100 MeV/u Kohlenstoffionen oder 250 kV Röntgenstrahlen reduziert dosisabhängig den B-Zell-Mitoseanteil im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Nach 72 h waren jedoch noch 11 % der Mitosen B-Zell Mitosen.

Es bleibt festzuhalten, dass in PHA-stimulierten Lymphozytenkulturen ein nicht unerheblicher Anteil der Mitosen B-Zell-Mitosen sind. Selbst nach relativ kurzer Stimulierungszeit (48 h) waren über 8 % der ausgewerteten Mitosen B-Zell-

Mitosen, nach 72 h Stimulierungsdauer waren sogar ca. $\frac{1}{4}$ aller ausgewerteten Mitosen B-Zell-Mitosen. Diese B-Zell-Mitosen würden bei klassischen Aberrationsanalysen fälschlicherweise als T-Zell-Mitosen gewertet.

Dies bedeutet, dass in zukünftigen strahlenbiologischen Untersuchungen mit Lymphozytenkulturen die darin vorhandenen B-Lymphozyten nicht mehr unberücksichtigt bleiben dürfen. Da sich in dieser Arbeit jedoch ebenfalls herausstellte, dass die B-Zellen die gleiche chromosomale Aberrationsrate ausweisen wie T-Zellen (Kapitel 4.7.2 und 4.7.3), bleiben die Ergebnisse/Aussagen früherer Experimente, die sich mit Aberrationsraten in Lymphozyten befassen, bestehen.

4.7.11 Apoptoserate von humanen B- und T-Lymphozyten nach PHA-Stimulation

Um zu überprüfen, ob humane B-Lymphozyten eine erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu humanen T-Lymphozyten aufweisen, wurde eine frisch isolierte Lymphozytenkultur mit PHA stimuliert und die Rate an apoptotischen B-Zellen im Verhältnis zu den Gesamtanteil an B-Zellen in der Kultur bestimmt. Die Zellen wurden hierfür nach 48 h, 72 h bzw. 96 h Stimulierung mit CD19-PE markierten Antikörpern gefärbt, anschließend mit 1 % Paraformaldehyd fixiert und die Zellkerne mit 1 µg/ml DAPI gefärbt. Bestimmt wurde der Anteil an apoptotischen B-Zellen in der Gesamtzahl aller Apoptosen und dem Anteil an B-Zellen in der jeweiligen Kultur. Der Quotient aus dem apoptotischen B-Zell-Anteil und dem Anteil an B-Zellen in der Gesamtkultur gibt Auskunft über die Häufigkeit von B-Zell-Apoptosen im Vergleich zur Apoptoserate der Gesamtpopulation in der Kultur. Bei einem Verhältnis von 1 besitzen die B-Lymphozyten die gleiche Apoptoserate wie die übrigen Lymphozyten in der Kultur (hauptsächlich T-Lymphozyten). Ist das Verhältnis kleiner als 1, ist die Apoptoserate der B-Zellen geringer und bei einem Verhältnis größer als 1 ist die Apoptoserate höher als die der T-Lymphozyten. In Abbildung 4.7.12 ist das Ergebnis eines Versuchs dargestellt.

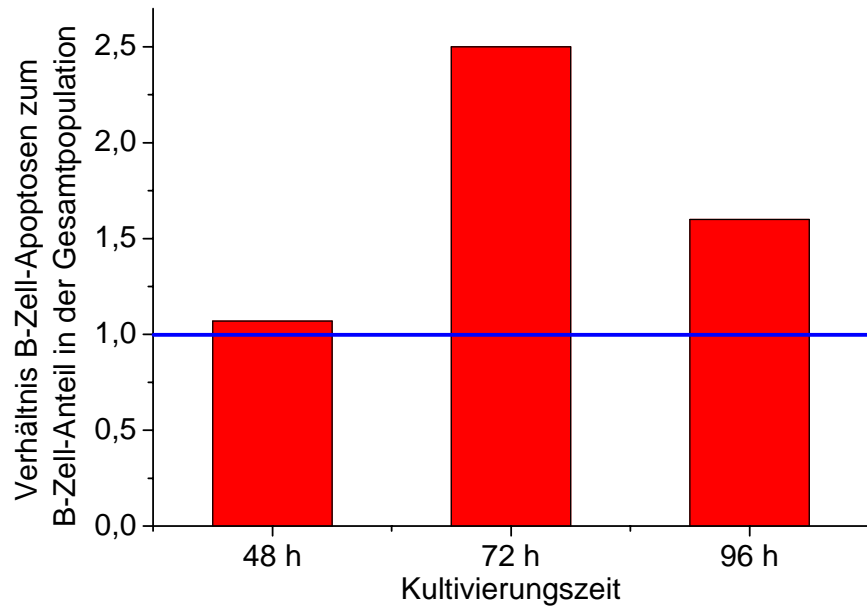


Abb. 4.7.12: Verhältnis des Anteils von B-Zell-Apoptosen zu dem Anteil an B-Zellen in der Gesamtpopulation. Dargestellt ist der Quotient des B-Zell-Apoptoseanteils zum B-Zellanteil in der Gesamtpopulation. Ist der Quotient gleich eins bedeutet dies, dass B-Lymphozyten die gleiche Apoptoserate aufweisen wie die übrigen Lymphozyten in der in der jeweiligen Kultur. Ist der Quotient größer als eins, ist die Apoptoserate der B-Lymphozyten gegenüber den T-Lymphozyten erhöht. Es wurden mindestens 1200 Zellen ausgewertet.

Wie in Abbildung 4.7.12 zu sehen, ist das Verhältnis von B-Zell-Apoptose zu T-Zell-Apoptose anfänglich gleich. Nach 72 h Kultivierung ist die Apoptoserate von B-Lymphozyten gegenüber der Rate von T-Lymphozyten stark erhöht. B-Zellen unterliegen etwa 2,5-fach häufiger dem apoptotischen Zelltod als T-Lymphozyten. Auch nach 96 h ist die Apoptoserate der B-Zellen gegenüber der Apoptoserate der T-Zellen erhöht.

Das Ergebnis zeigt, dass B-Zellen im Vergleich zu T-Zellen in einer PHA-stimulierten Lymphozytenkultur einer erhöhten Apoptoserate unterliegen, wenn sie 72 h oder länger stimuliert werden. Dies erklärt, warum sich die gemessene Mitoserate der B-Zellen in PHA-stimulierten Kulturen (siehe Abschnitt 4.7.10 und 4.7.11) nicht deutlich auf die Gesamtzellzahl der B-Zellen niederschlägt, wie die Ergebnisse aus Abschnitt 4.7.9 zeigen.

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von Kohlenstoffionenstrahlen auf Makrophagen und B-Lymphozyten im Rahmen der Tumorthherapie bei der GSI in Darmstadt zu untersuchen. Makrophagen sind als Auslöser inflammatorischer Reaktionen an der Bildung und Progression von strahlentherapeutischen Nebenwirkungen wie Fibrose, Pneumonitis und Mukositis beteiligt, vor allem durch die Produktion inflammatorischer Zytokine und Stickstoffmonoxid. Während einige Untersuchungen über die Effekte von Röntgenstrahlen auf Makrophagen berichtet haben, gibt es bis jetzt keine Studien über die Effekte von Kohlenstoffionenstrahlen auf diese Zellen. Aus diesem Grund wurden die allgemeine Zellvitalität, die Produktion inflammatorischer Zytokine, die Produktion von Stickstoffmonoxid und die phagozytische Aktivität von Makrophagen nach Exposition mit Röntgenstrahlen und Kohlenstoffionenstrahlen näher untersucht. Hierfür wurden sowohl murine RAW 264.7 Makrophagen, als auch humane, *in vitro* differenzierte Makrophagen verwendet.

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Strahlensensitivität humaner B-Lymphozyten. In strahlenbiologischen Untersuchungen werden häufig Lymphozytenkulturen verwendet, da sie einfach zu erhalten sind und durch Zugabe von speziellen Mitogenen zur Proliferation angeregt werden können. Lymphozyten stellen jedoch eine heterogene Gruppe von Blutzellen dar, mit vielen funktionell unterschiedlichen Subtypen. Bisher wurden vor allem T-Lymphozyten untersucht, da sie den größten Anteil an der Lymphozytenpopulation darstellen. Zytogenetische Untersuchungen an B-Lymphozyten nach Strahlenexposition gibt es bisher nur sehr wenige (Schwarz et al., 1980; Wuttke et al., 1993; Vral et al., 1998, 2001). Für eine Risikoabschätzung von Spätfolgen nach einer therapeutischen Kohlenstoffionentherapie ist es wichtig, die Strahlensensitivität der humanen B-Zellen auf der Ebene chromosomaler Aberrationen Zellen zu kennen.

5.1 Allgemeine Zellvitalität von Makrophagen nach Bestrahlung

Humane und murine Makrophagen zeigen nach Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlung und 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen keinen deutlichen Rückgang ihrer Zellvitalität im Untersuchungszeitraum. Nach 24 h betrug der Rückgang lediglich ~20 %. Weiterhin ist ein radioprotektiver Effekt der LPS-Aktivierung in den murinen Makrophagen festzustellen. Dies bestätigt die Ergebnisse von Hildebrandt et al. (1998, 2002) und Pons et al (1997). Lediglich 48 h nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen konnte in murinen Zellen ein dosisabhängiger Abfall der Zellvitalität um 40 - 50 % beobachtet werden. Kohlenstoffionen reduzierten die Zellvitalität generell etwas effektiver als Röntgenstrahlen.

Der radioprotektive Effekt der LPS-Aktivierung war bei humanen Makrophagen nicht zu erkennen. Gessani et al. (1993) konnten zeigen, dass *in vitro* differenzierte

humane Makrophagen weniger LPS-Affinität besitzen als frisch isolierte Monozyten und somit weniger stimuliert werden. Dies erklärt teilweise, warum die humanen Makrophagen keinen radioprotektiven Effekt nach LPS-Aktivierung aufweisen.

Im Vergleich von humanen AG1522D Fibroblasten mit primären humanen G₀-Lymphozyten zeigt sich die besondere Strahlenresistenz von Makrophagen. Schon eine Dosis von 16 Gy Röntgenstrahlen reduzierte die Zellvitalität der Fibroblasten und Lymphozyten um 50 – 70 %.

Die in Gegensatz zu Fibroblasten und Lymphozyten hohe Strahlenresistenz von Makrophagen erklärt sich durch die natürlichen Funktionen der Makrophagen. Sie sind in der Lage, große Mengen an Radikalen zu bilden, um fremde Mikroorganismen abzutöten. Um sich selbst vor den schädlichen Auswirkungen zu schützen, können sie Entgiftungsenzyme wie bspw. die Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD) besonders effektiv bilden. Hachiya et al., (1997), Wong, (1995) und Lin et al. (1993) konnten zeigen, dass die Bildung von MnSOD durch Bestrahlung induziert wird und Zellen vor den schädlichen Auswirkungen der strahleninduzierten Radikalen schützt. Weiterhin vermittelt die Überexpression von MnSOD ein erhöhtes Zellüberleben nach Bestrahlung (Epperly et al., 2003b; Hirose et al., 1993). Die natürlichen Schutzmechanismen der Makrophagen vor Radikalen dienen als Ansatzpunkt von neuen Antioxidativen-Gentherapien, die den Schutz von Normalgewebe bei Strahlentherapien und der Radiosensibilisierung von Tumoren vermitteln (Epperly et al., 2005; 2006; 2007a; 2007b).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Makrophagen bedingt durch ihre Bildung von antioxidativen Enzymen und wegen ihres relativ differenzierten Zellstatus sehr strahlenresistent sind. Hinzu kommt noch die fehlende Proliferationsfähigkeit der ausdifferenzierten Makrophagen. Da sie sich nicht mehr teilen, können DNA-Schäden eher toleriert werden. Selbst nach Bestrahlung mit 32 Gy niederenergetischen Kohlenstoffionen, dies entspricht etwa 65 direkten Kerntreffern, verlieren die Makrophagen kaum an Zellvitalität. Weiterhin ist ein radioprotektiver Effekt durch die Aktivierung mit LPS zu sehen, der wahrscheinlich auf eine verstärkte Induktion der Bildung von Entgiftungsenzymen, die durch LPS hervorgerufen wird, zurückzuführen.

5.2 Inflammatorische Zytokine

Bei den häufig auftretenden Nebenwirkungen einer therapeutischen Strahlentherapie wie Fibrose und Pneumonitis sind immer proinflammatorische Zytokine involviert und nachweisbar (Müller et al., 2007; Haase et al., 2004; Rube et al., 2005, 2004a; Herskind et al., 1998). Die Zytokine, die hauptsächlich nachgewiesen werden können, sind IL-1, TNF- α und IL-6. In der vorliegenden Arbeit wurde die Produktion von IL-1 β und TNF- α von Makrophagen nach Bestrahlung untersucht um zu klären, ob Bestrahlung direkt Makrophagen zur Produktion inflammatorische Zytokine anregen kann, oder ob dies durch sekundäre Aktivierung der Zellen erfolgt. Weiterhin wurde untersucht, ob die Bestrahlung mit

250 kV Röntgenstrahlen bzw. 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen eine Modulation der Zytokinproduktion von bereits aktivierten Makrophagen verursachen kann.

5.2.1 TNF- α -Produktion

Die *in vitro* Untersuchung der TNF- α -Produktion humaner und muriner Makrophagen nach Bestrahlung mit 250kV Röntgenstrahlen und 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen zeigte, dass nicht stimulierte Zellen im untersuchten Zeitraum bis 48 h nach Bestrahlung keinerlei TNF- α sezernieren. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Iwamoto & McBride (1994), Hachiya et al. (1997) und Sherman et al. (1991). Hachiya et al. (1997) fanden zwischen 100 und 330 pg/ml TNF- α in den Zellkulturüberständen der mit 40 Gy bzw. 80 Gy (Co^{60} - γ -Strahlen) bestrahlten Makrophagen. Iwamoto & McBride (1994) und Sherman et al. (1991) wiesen TNF- α -Produktion indirekt über die Messung der TNF- α -mRNA nach. Im Gegensatz zu Iwamoto & McBride (1994), Hachiya et al. (1997) und Sherman et al. (1991) fand Pons et al. (1997) nach Bestrahlung mit 5 - 40 Gy Gammastrahlen keinerlei TNF- α , was mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmt. Die Bestrahlung alleine war nicht ausreichend, um die Makrophagen zu aktivieren.

In LPS-aktivierten murinen und humanen Makrophagen wurde über den gesamten untersuchten Dosisbereich von 0 - 32 Gy TNF- α im Zellkulturüberstand nachgewiesen. In vorhergehenden Arbeiten von Schilling (2000) und Ohlweiler (2005) in der Arbeitsgruppe Nixdorff/TU-Darmstadt konnte gezeigt werden, dass die TNF- α -Produktion nach LPS-Stimulation wellenförmig verläuft und nach 16 h bzw. 24 h ein relatives Maximum erreicht. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit vorwiegend die Zytokinmenge nach 24 h bestimmt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die produzierte TNF- α -Menge mit steigender Dosis leicht abnimmt. Es war kein Unterschied in der Strahlenqualität in murinen Makrophagen feststellbar. Der Abfall der TNF- α -Menge korreliert dabei mit der Abnahme der allgemeinen Zellvitalität und ist somit nicht Folge einer direkten Modulation der Zytokinsynthese, sondern eine Folge der verringerten Zellvitalität bzw. der damit verbundenen metabolischen Aktivität der Zellen.

Nach 48 h war die Menge an produziertem TNF- α stark zurückgegangen und betrug nur noch ca. 10 % des Wertes nach 24 h. Der Kurvenverlauf der Zytokinproduktion aktivierter Makrophagen nach 48 h (Abbildung 4.3.3) entspricht mit guter Näherung den Verlauf der Kerntrefferwahrscheinlichkeit für 0 Kerntreffer in Abhängigkeit der applizierten Dosis (Abbildung 5.1).

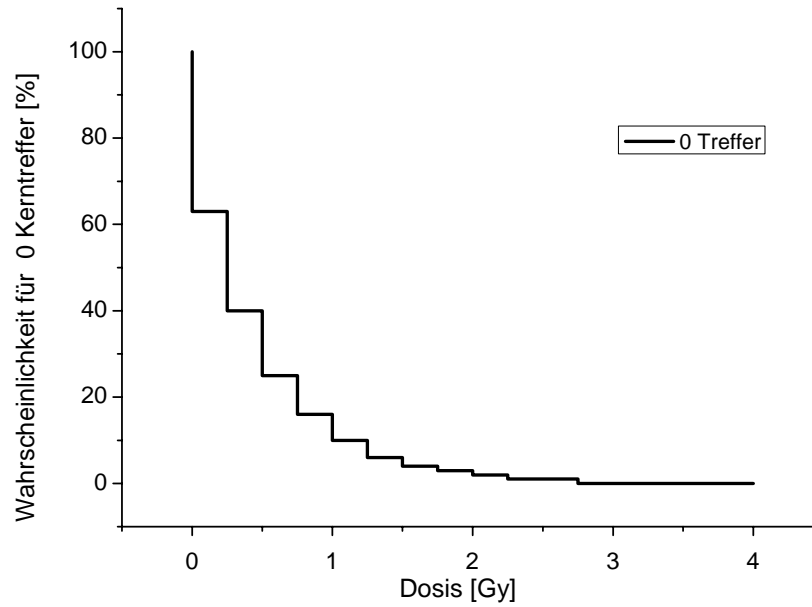


Abb. 5.1: Wahrscheinlichkeit für 0 Kerntreffer bei Bestrahlung mit 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen in Abhängigkeit der applizierten Dosis. Die Berechnung erfolgte mit Formel 3 (siehe Kapitel 2.4). Als Zellkerngröße der murinen Makrophagen wurde der arithmetische Mittelwert der Makrophagen-Zellkerngrößenmessung (Kapitel 4.1.1) von 51 µm² herangezogen.

Dies deutet darauf hin, dass die TNF- α -Produktion in aktivierten Makrophagen durch die Bestrahlung moduliert werden kann, jedoch erst nach 48 h. Nach 24 h war diese Modulation nicht zu erkennen. Gegenüber der unbestrahlten Kontrolle nimmt die Zytokinproduktion nach 48 h um 60 % ab, sobald eine Zelle einen direkten Kerntreffer erhält. Ein einziger Kerntreffer ist ausreichend, um diesen Effekt auszulösen, mehrere Kerntreffer in einen Zellkern wirken nicht kumulativ. Entweder überdeckt die starke LPS-Stimulierung die Strahlenmodulation nach 24 h, oder die getroffenen Zellen brauchen mindestens 48 h, um auf den Kerntreffer mit einer Änderung ihrer Zytokinproduktion zu reagieren.

Festzuhalten bleibt, dass sowohl humane als auch murine Makrophagen durch Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen oder 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen alleine, ohne vorherige Stimulierung mit LPS, nicht zur Produktion des proinflammatorischen Zytokins TNF- α angeregt werden können, gemessen im untersuchten Zeitraum bis 48 h nach Bestrahlung. Das nach therapeutischen Strahlentherapien gefundene TNF- α in entzündlichen Geweben (Iwamoto & McBride, 1994; Hachiya et al., 1997; Sherman et al., 1991) stammt wahrscheinlich aus Makrophagen, die erst Tage/Wochen nach der Behandlung aktiviert wurden.

5.2.2 IL-1 β

Ebenso wie TNF- α ist IL-1 β an der Bildung und Persistenz einer strahleninduzierten Fibrose/Pneumonitis beteiligt (Liu et al., 2006; Okunieff et al., 2006; Schaeue et al., 2005; Haase & Rodemann, 2004; Gridley et al., 1998). In

Versuchen mit Mauszellen konnte gezeigt werden, dass peritoneale Makrophagen durch Bestrahlung zur dauerhaften Bildung von IL-1 β -mRNA angeregt werden können (Rubin et al., 1995; Johnston et al., 1995; Johnston et al., 1996). Hosoi et al. (2001) fanden in frisch isolierten, peritoneal Makrophagen bestrahlter Mäuse eine dosisabhängige Induktion der IL-1 β -mRNA Synthese, jedoch nur im Zeitraum von 1h – 4h nach Bestrahlung. Es bleibt jedoch zu klären, ob die Bestrahlung selbst die Makrophagen aktivierte, oder ob dies durch sekundäre Aktivierungsprozesse, bzw. durch die anschließende Isolierung der Makrophagen geschah. Es muss jedoch gesagt werden, dass in den oben genannten Arbeiten nur die Bildung von IL-1 β -mRNA untersucht wurde, nicht die Proteinbildung bzw. Sezernierung.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen steht wiederum die Arbeit von Pons et al (1997), der keine Induktion von IL-1 β -mRNA oder IL-1 β -Protein nach Bestrahlung nachweisen konnte. Der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse liegt wahrscheinlich in der unterschiedlichen Methodik der jeweiligen Experimentatoren. Pons et al wiesen darauf hin, dass durch Kontaminationen der Makrophagen durch Lymphozyten eine basale Aktivierung der Makrophagen stattfinden kann. Die Lymphozyten in einer solchen kontaminierten Makrophagenkultur würden vermehrt in die Apoptose eintreten bzw. nekrotischem Zelltod unterliegen. Die Makrophagen können anschließend durch Phagozytose diese Zellen aufnehmen und dadurch aktiviert werden. Weiterhin ist die optimale Behandlung der unbestrahlten Kontrollzellen wichtig um auszuschließen, dass die Zellen durch Stress (Mediumswechsel, Transfer zum Bestrahlungsplatz, Temperatur und CO₂-Änderungen) aktiviert werden. Die durch Iwamoto & McBride (1994) Hachiya et al. (1997), Sherman et al. (1991), Rubin et al. (1995), Johnston et al. (1995), Johnston et al. (1996) und Hosoi et al. (2001) gefundene Expression von TNF- α - und IL-1 β -mRNA können also durch Unzulänglichkeiten in der Isolation und Behandlung der Makrophagen erklärt werden. Diese oben genannten Autoren gehen nicht auf die erzielte Reinheit ihrer Makrophagenkulturen ein, weiterhin beschreiben sie nicht, ob deren unbestrahlten Kontrollen exakt so behandelt wurden wie die bestrahlten Zellen.

Ferner können kleinste Mengen von LPS im Serum des Kulturmediums eine Aktivierung der Makrophagen verursachen. Inwieweit dies in den o.g. Arbeiten berücksichtigt wurde ist nicht bekannt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass 250 kV Röntgenstrahlen und 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen murine Makrophagen *in vitro* nicht direkt zur IL-1 β -Produktion aktivieren können (siehe Abbildung 4.4.1 und 4.4.2). Es zeigte sich jedoch ein dosisabhängiger, modulierender Effekt der jeweiligen Strahlung auf die IL-1 β -Produktion von LPS-aktivierten Makrophagen. Der modulierende Effekt war von der Strahlenqualität abhängig. LPS-aktivierte murine Makrophagen, die mit 250 kV Röntgenstrahlen bestrahlt wurden, zeigten einen leichten, dosisabhängigen Anstieg der IL-1 β -Produktion im Dosisbereich von 1 Gy bis 32 Gy. Im Dosisbereich von 0,25 Gy bis 1 Gy kam es jedoch zu einem leichten Abfall in der IL-1 β -Bildung. Trott et al (1994), Seegenschmiedt et al (2000), und Hildebrandt & Kamprad (2003) konnten zeigen, dass Bestrahlung von Makrophagen mit Dosen von 0,2 Gy bis 1 Gy Röntgenstrahlen zu einem anti-inflammatorischen-Effekt

führen, der vor allem auf einer verringerten Stickstoffmonoxid-Produktion und verringerten Bildung von Adhärenzmolekülen beruht. Therapeutisch wird dieser Effekt seit langem zur Behandlung von chronischen, entzündlichen Erkrankung genutzt (siehe Kapitel 2.6). Der gemessene Abfall der IL-1 β -Produktion könnte ebenso auf diesem allgemeinen anti-inflammatorischen Effekt beruhen. Der genaue molekulare Mechanismus ist jedoch noch nicht aufgeklärt.

Im Gegensatz zum Anstieg in der IL-1 β -Produktion nach Röntgenbestrahlung kam es zu einer dosisabhängigen verringerten Bildung von IL-1 β in LPS-aktivierten murinen Makrophagen, die mit 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen bestrahlt wurden. Dieser Unterschied in der Zytokinproduktion deutet an, dass je nach verwendeter Strahlenart unterschiedliche transkriptionelle/translationelle Mechanismen aktiviert werden.

In nicht-stimulierten humanen Makrophagen kam es durch Bestrahlung mit 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen zu keiner Aktivierung und somit zu keiner Bildung von IL-1 β . Wie schon in murinen Zellen gezeigt wurde, reicht die Bestrahlung alleine nicht aus, um murine und humane Makrophagen zu aktivieren und sie somit zur Produktion von TNF- α oder IL-1 β anzuregen. Die Ausbildung entzündlicher Prozesse in bestrahltem Gewebe ist somit nicht Folge einer direkten strahleninduzierten Aktivierung von isolierten Gewebemakrophagen.

5.3 Stickstoffmonoxid (NO)

Neben den inflammatorischen Proteinen spielt Stickstoffmonoxid (NO) eine entscheidende Rolle bei der Induktion und Aufrechterhaltung entzündlicher Prozesse (siehe Kapitel 2.7.3). Makrophagen produzieren nach Aktivierung durch LPS relativ große Mengen an NO. In der vorliegenden Arbeit konnte NO nicht in humanen Makrophagen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen oder Kohlenstoffionen gemessen werden, auch nicht nach LPS-Aktivierung. Obwohl humane Makrophagen das induzierbare Stickstoffoxidsynthase-Gen besitzen, können sie nicht *in vitro* durch LPS-Stimulierung zur NO-Produktion induziert werden (Förstermann & Kleinert, 1995). Um die Produktion von NO in humanen Makrophagen zu induzieren ist eine komplexe Mischung von Agonisten erforderlich (Kleinert et al., 2004). Somit ist ein direkter Nachweis nicht möglich. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit nur über die NO-Produktion in murinen Makrophagen berichtet. Stickstoffmonoxid wirkt jedoch nicht nur als pro-inflammatorischer Mediator, sondern besitzt auch Tumorthherapie-relevante Eigenschaften. In der Tumorbilogie werden NO-produzierende Chemikalien vermehrt als radiosensibilisierendes Agens bei Vorhandensein von hypoxischen Tumoren eingesetzt (Wardman, 2007; Wardman et al., 2007). NO sensibilisiert hypoxische Tumorzellen *in vitro* effektiver als Sauerstoff. In hohen Konzentrationen wirkt NO zudem toxisch auf umliegende Zellen, was in einem Tumor eine wünschenswerte Eigenschaft ist, jedoch nicht im Normalgewebe.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, ob ionisierende Strahlung in der Lage ist, Makrophagen zur Produktion von NO anzuregen, bzw. ob und wie die

Strahlung eine LPS-induzierte NO-Produktion modulieren kann. In ruhenden, nicht LPS-Aktivierten Makrophagen konnte nach Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlung bzw. 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen keine NO-Bildung nachgewiesen werden. Eine Bestrahlung alleine war nicht ausreichend, um Makrophagen zur Bildung von NO anzuregen, wie es schon bei der TNF- α - und IL-1 β -Messung zu sehen war. Ohta et al. (2007) wiesen dagegen in ihrer Arbeit nach, dass im Serum bestrahlter Mäuse erhöhte Nitratkonzentrationen vorliegen und begründeten dies mit einer induzierten NO-Produktion durch aktivierte Makrophagen. Wie schon in den Diskussionen zur TNF- α und IL-1 β -Produktion angeführt, ist das Vorhandensein von inflammatorischen Mediatoren nach *in vivo* Bestrahlung sehr wahrscheinlich auf eine sekundäre Aktivierung von Makrophagen zurückzuführen. Gerade bei *in vivo* Versuchen muss immer damit gerechnet werden, dass Makrophagen durch bereits vorliegende intrinsische Aktivierung bzw. im Zuge der anschließenden Isolierung Zytokine oder NO ausschütten.

LPS-aktivierte Makrophagen zeigten nach Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen im Dosisbereich zwischen ~0,5 Gy und 2 Gy einen deutlichen Abfall in der NO-Produktion. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen von Hildebrandt et al. (1998; 2003) überein. Hildebrandt et al. benutzten ebenfalls murine RAW 264.7 Makrophagen als Modellsystem, sie stimulierten Zellen jedoch neben LPS noch mit Interferon- γ . Schaeue et al. (2002) wiesen weiterhin einen verminderten „oxidativen Burst“ in aktivierten Makrophagen nach, wenn diese mit Dosen zwischen 0,5 Gy und 2 Gy bestrahlt wurden. Während eines oxidativen Bursts produzieren aktivierte Makrophagen neben NO eine große Menge an unterschiedlichen Sauerstoffradikalen, die ebenso wie NO toxisch wirken und eine Inflammation auslösen bzw. verstärken können. Die verringerte NO-Produktion in diesem Dosisbereich erklärt teilweise die klinische Wirkung von so genannter Low-Dose Strahlentherapie (LD-RT; siehe auch Kapitel 2.1.1).

Nach Bestrahlung mit Dosen über 2 Gy Röntgenstrahlen erreichte die NO-Produktion den Stand der unbestrahlten Kontrolle, es war keine weitere Steigerung mehr zu beobachten. Ein modulierender Effekt war nur im Dosisbereich zwischen ~0,25 Gy bis 2 Gy sichtbar. Dieses Ergebnis stimmt ebenfalls mit den Ergebnissen von Hildebrandt et al. (1998) und Hildebrandt et al. (2003) überein.

Nach Bestrahlung von aktivierten Makrophagen mit 9,8 MeV/u konnte ein starker, dosisabhängiger Anstieg der NO-Produktion beobachtet werden. Der modulierende Effekt der Partikelstrahlung unterschied sich somit stark von der Photonenbestrahlung. Unbestrahlte, aktivierte Zellen sezernierten ~20 μ M NO in das Medium. Zellen, die mit 32 Gy bestrahlt wurden, produzierten jedoch bis zu 140 μ M NO. Prinzipiell garantiert eine LPS-Zugabe von 1 μ g/ml eine vollständige Aktivierung, und eine zusätzliche Stimulation bspw. mit cAMP bewirkt nur eine geringe weitere Steigerung der NO-Produktion um ca. 20 % (Ohlweiler 2005). Der 7-fache Anstieg nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen beruht somit nicht auf einer unvollständigen LPS-Aktivierung der Zellen. Auffällig ist der Zusammenhang zwischen der IL-1 β -Produktion und NO-Produktion von Makrophagen, die mit 9,8

MeV/u bestrahlt wurden. Wie in Abbildung 4.4.2 gezeigt, nimmt die IL-1 β -Konzentration dosisabhängig ab, die NO-Produktion jedoch dosisabhängig zu (Abbildung 4.5.2).

Dieser inverse Zusammenhang der IL-1 β - und NO-Produktion wurde in früheren Arbeiten beobachtet (Schilling et al., 2001). Ferner konnte Ohlweiler (2005) zeigen, dass durch Inhibierung der Phosphodiesterase-4 (PDE4), ein wichtiges Enzym im Signaltransduktionsweg der IL-1 β -Regulation, die IL-1 β -Konzentration zunahm. Gleichzeitig nimmt jedoch die NO-Produktion ab. Eine chemisch induzierte Steigerung der IL-1 β -Produktion war in diesen Arbeiten somit immer mit einem Abfall der NO-Produktion gekoppelt.

Es ist bekannt, dass Zellen auf eine Bestrahlung mit Aktivierung bzw. mit Transkription von *nuclear factor* κ B (NF- κ B) reagieren (Wilson et al., 1993; Mohan & Meltz, 1994; Yamagishi et al., 1997; Pajonk et al., 1999; Didelot et al., 2001; Natarajan et al., 2002; Sharma et al., 2007). NF- κ B ist ein allgemeiner Transkriptionsaktivator, der inaktiv im Zytoplasma vorliegt und nach Aktivierung in den Zellkern eintritt und dort die Transkription verschiedene Zielgene induziert, unter anderem auch die Gene für IL-1 β und iNOS.

Die verminderte IL-1 β -Produktion mit gleichzeitiger Steigerung der NO-Produktion lässt vermuten, dass durch die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen NF- κ B verstärkt aktiviert wird, im Gegensatz zu Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen, und sich somit die Transkription von iNOS erhöht. Der Grund dafür, warum IL-1 β nicht ebenfalls verstärkt gebildet wird, liegt vermutlich in einer Konkurrenz um Bindestellen im Promotor zwischen NF- κ B und einem weiteren Transkriptionsfaktor. Für die Aktivierung von IL-1 β ist NF- κ B zwar ein wichtiger Transkriptionsaktivator, aber kein essentieller (Ohlweiler, 2005). Essentiell ist das so genannte *cAMP-response element-binding protein* (CREB), das ebenfalls wie NF- κ B ein Transkriptionsaktivator ist (Auron & Webb, 1964). Für die NO-Produktion ist NF- κ B essentiell, CREB hingegen nicht, obwohl in der Promotorregion des iNOS-Gens mehrere CRE-Bindestellen vorhanden sind. Parry & Mackman (1997), Gray et al. (1993) und Ohlweiler (2005) vermuten, dass es zwischen CREB und NF- κ B zur Konkurrenz kommt, wenn für beide Transkriptionsaktivatoren Bindestellen vor dem Gen existieren, was sowohl für IL-1 β als auch für iNOS der Fall ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich das größere Potential der Kohlenstoffionenbestrahlung gegenüber Photonenbestrahlung im Hinblick auf die verstärkte Aktivierung des iNOS-Gens in bereits aktivierten Makrophagen.

5.4 Phagozytische Aktivität

Die Aufnahme und Prozessierung von Mikroorganismen und apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen stellt eine weitere wichtige Aufgabe der Makrophagen im Immunsystem dar. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob ionisierende Strahlung in der Lage ist, die phagozytische Aktivität von Makrophagen zu beeinflussen. Hierfür wurden den bestrahlten Makrophagen Latex-Beads präsentiert, die von den

Zellen gebunden und phagozytiert werden konnten. Die durchschnittliche Menge an Beads pro Zelle spiegelt die phagozytische Aktivität wieder.

Es konnte gezeigt werden, dass murine Makrophagen nach Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen einen leichten, dosisabhängigen Anstieg ihrer phagozytischen Aktivität aufweisen. Im Dosisbereich zwischen 0,5 und 2 Gy war die Aufnahme der Beads jedoch vermindert, was möglicherweise auf einen generellen anti-inflammatorischen Effekt von Röntgenstrahlen in diesem Dosisbereich zurückzuführen ist (Rödel et al., 2002; Rödel et al., 2007). Allerdings war dieser Abfall bei nicht aktivierten Zellen nicht signifikant (Student's T-Test); in LPS-aktivierten Zellen war nur die Probe, die mit 1 Gy bestrahlt wurde, war signifikant erniedrigt ($p = 0,007$). Nicht aktivierte Makrophagen internalisierten wesentlich weniger Beads im Vergleich zu LPS-aktivierten Zellen. Die LPS-Aktivierung steigert somit grundsätzlich die phagozytische Aktivität von Makrophagen, die Bestrahlung verstärkt diese zusätzlich noch leicht bei Dosen über 2 Gy. Im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle phagozytierten Zellen, die mit 32 Gy bestrahlt wurden, 1,3-fach (LPS-aktivierte Zellen) bzw. 2,4-fach (nicht aktivierte Zellen) mehr Beads.

In murinen Makrophagen, die mit 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen bestrahlt wurden, kam es zu einem deutlichen, dosisabhängigen Anstieg der durchschnittlich aufgenommenen Anzahl an Beads. Im Gegensatz zur Bestrahlung mit Röntgenstrahlen war kein Abfall im Dosisbereich zwischen 0,5 Gy und 2 Gy zu erkennen. In Zellen, die mit mehr als 4 Gy bestrahlt wurden, ist ein Sättigungseffekt festzustellen, die phagozytische Aktivität stieg nicht weiter an. Auch in diesen Experimenten internalisierten LPS-aktivierte Zellen mehr Beads pro Zelle als nicht aktivierte. Im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle war die phagozytische Aktivität 3-fach (LPS-aktivierte Zellen) bzw. 3,2-fach (nicht aktivierte Zellen) gesteigert.

Übereinstimmend zu diesen Ergebnissen wiesen Tasat et al (2003b) eine 1,3 bis 1,4-fache Steigerung der phagozytischen Aktivität von Alveolarmakrophagen nach. Die Zellen wurden vor der Messung niederenergetischen Protonen bestrahlt, die Dosen lagen zwischen 10 Gy und 75 Gy. Ein RBW-Wert lässt sich jedoch aus der Veröffentlichung von Tasat et al. (2003b) nicht ableiten, da in dieser Arbeit keine Referenzmessung mit Röntgenstrahlen durchgeführt wurde.

Der Anteil an phagozytierenden Makrophagen in den durchgeführten Experimenten blieb annähernd gleich, ca. 90 % aller Makrophagen nahmen Beads auf, unabhängig davon, ob sie mit LPS aktiviert wurden oder nicht. Der Anteil an phagozytierenden Makrophagen wurde auch durch Bestrahlung nicht verändert. Der Unterschied in der phagozytischen Aktivität beruhte allein auf einer vermehrten Aufnahme der Beads pro Zelle (siehe Abbildung 5.4).

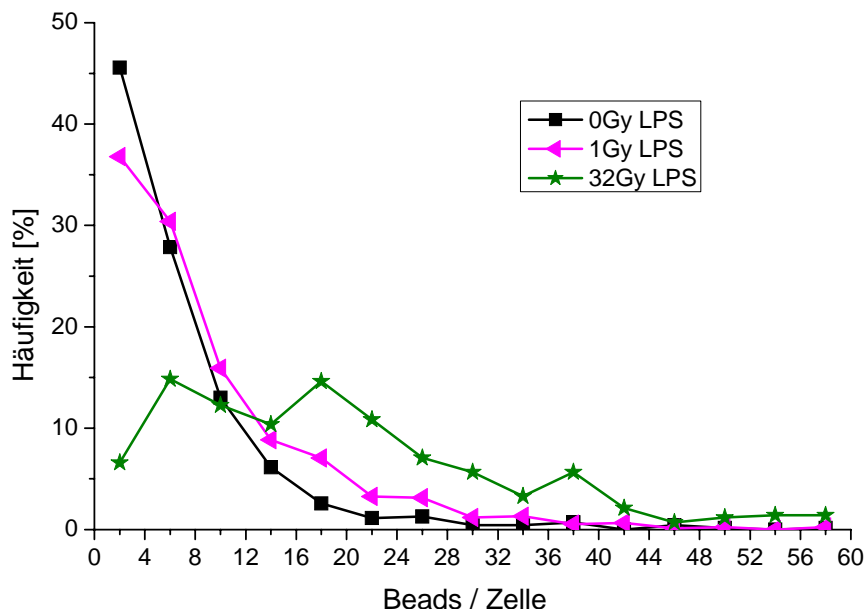


Abb. 5.4: Häufigkeitsverteilung der phagozytierten Latex-Beads in murinen Makrophagen pro Zelle. Dargestellt sind die Verteilung der unbestrahlten Kontrolle, sowie die mit 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen bestrahlten (1 Gy und 32 Gy). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nicht alle Dosen von 0 Gy bis 32 Gy gezeigt. Für die Darstellung der Häufigkeit wurde eine Intervallbreite von jeweils 4 Beads pro Zelle gewählt

Wie in Abbildung 5.4 zu sehen ist, phagozytieren unbestrahlte Makrophagen am häufigsten zwischen 1 und 4 Beads pro Zelle (ca. 46 % aller Zellen). In Makrophagen, die mit 1 Gy bzw. 32 Gy 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen bestrahlt wurden, verschiebt sich die Verteilung hin zu einer größeren durchschnittlichen Anzahl an Beads pro Zelle. Nach 32 Gy haben nur noch 7 % der Zellen 1-4 Beads phagozytiert; der Anteil Zellen, die bspw. mehr als 20 Beads aufgenommen haben, ist jedoch stark gestiegen.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass Bestrahlung mit Röntgenstrahlen bzw. 9,8 MeV/u Kohlenstoffionen die phagozytische Aktivität von Makrophagen steigert. Diese Steigerung war nicht von einer LPS-Aktivierung abhängig. Bestrahlung mit Kohlenstoffionen steigerte die phagozytische Aktivität stärker als 250 kV Röntgenstrahlen, der RBW der Kohlenstoffionen lag bei 2,3 für LPS-aktivierte Zellen bzw. bei 1,3 für nicht aktivierte. Im Dosisbereich zwischen 0,5 Gy und 2 Gy Röntgenstrahlen konnte ein leichter Abfall der phagozytischen Aktivität festgestellt werden, der jedoch für nicht aktivierte Zellen nicht signifikant war.

5.5 Zusammenfassung / Aussichten Teil 1: Makrophagen

Durch die Fähigkeit inflammatorische Reaktionen auslösen, bzw. eine Inflammation aufrechterhalten zu können sind Makrophagen von besonderem Interesse bei der Tumorthherapie mit ionisierender Strahlung. Durch bereits bestehende Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Makrophagen an der Ausbildung und Persistenz strahleninduzierter Nebenwirkungen wie Fibrose, Pneumonitis, Mucositis etc. beteiligt sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass Makrophagen eine relativ strahlenresistente Zellpopulation darstellen, im Vergleich zu Lymphozyten und Fibroblasten. Zieht man weiterhin den natürlichen Verlust der Teilungsfähigkeit der Makrophagen in betracht, so ist davon auszugehen, dass die während einer therapeutischen Strahlentherapie mitbestrahlten Makrophagen relativ lange im Gewebe überleben können und sich somit an einer inflammatorischen Reaktion in diesem Gewebe beteiligen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Makrophagen nicht direkt durch eine Bestrahlung zur Produktion inflammatorischer Zytokine oder Stickstoffmonoxid angeregt werden. Eine Aktivierung und damit verbundene Zytokinproduktion muss durch eine sekundäre, indirekte Aktivierung erfolgen. Lorimore et al. (2001) konnten zeigen, dass durch Phagozytose von strahleninduzierten apoptotischen Zellen Makrophagen dauerhaft aktiviert werden können und eine Inflammation auslösen. Dies ist ein ungewöhnliches Ergebnis, da die Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Makrophagen gewöhnlich keine Inflammation auslöst.

Die in dieser Arbeit verwendeten Kohlenstoffionen mit der Energie von 9,8 MeV/u liegen bei einer therapeutischen Strahlentherapie mit Kohlenstoffionen erst im Tumervolumen vor. Das Gewebe im Eingangskanal erhält nur eine geringe Dosis (inverses Dosisprofil, siehe Kapitel 2.4 und 2.5). Weiterhin kann durch die erhöhte Relative Biologische Wirksamkeit der Kohlenstoffionen die physikalisch applizierte Dosis gesenkt werden (Jäkel et al. 2007). Die geringe Dosis im Eingangsbereich und die damit verbundene geringere Anzahl an apoptotischen Zellen sorgt wahrscheinlich dafür, dass sehr wenige, durch Makrophagen ausgelöste inflammatorischen Nebenwirkung auftreten. Klinische Studien belegen, dass nach einer Kohlenstoffionetherapie nur sehr wenige Patienten Nebenwirkungen erleiden und diese gewöhnlich nicht sehr stark ausgeprägt sind (Schulz-Ertner et al., 2007).

Makrophagen befinden sich nicht nur im gesunden Gewebe. Bis zu 80 % der Zellmasse eines soliden Tumors besteht aus Makrophagen (Bingle et al., 2002). Eine große Anzahl so genannter Tumor-assoziierten-Makrophagen (TAM) in einem Tumor korreliert in vielen Fällen mit der Überlebensrate (Lewis & Pollard, 2006), siehe Tabelle 5.5. Die TAMs spielen eine entscheidende Rolle in der Tumor-Progression. Einige Studien zeigen, dass TAMs nur eine geringe Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen haben und diese die Tumorzell-Proliferation sogar durch Expression von Wachstumsfaktoren wie bspw. *epidermal growth factor* (EGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor β 1* (TGF β 1), *hepatocyte growth factor* (HGF), *basic fibroblast growth factor* (bFGF) stimulieren (Goswami et al., 2005; Burke et al., 2003; Lewis & Murdoch, 2005). Weiterhin produzieren diese TAMs nur in einem sehr geringen Maße NO.

Korrelation hoher Anzahl TAMs mit der Überlebensrate bei diversen Krebsarten/Entstehungsorten	
Günstige Überlebensprognose:	Schlechte Überlebensprognose:
Magen	Brust
Kolorektal	Prostata
Melanom	Endometrial-Karzinom
	Blase
	Nieren
	Esophageal
	Schwammzell-Karzinom
	Malignes Uveal Melanom
	Follikuläres Lymphom

Tabelle 5.5: Korrelation der Anzahl an Tumor-Assoziierten-Makrophagen (TAM) in einem Primärtumor mit der Überlebensprognose bei verschiedenen Krebsarten bzw. Entstehungsorten der Krebserkrankung. Tabelle nach Lewis & Pollard, 2006, modifiziert.

Die in dieser Arbeit festgestellte starke Induktion der NO-Produktion in *in vitro* bestrahlter Makrophagen könnte einen weiteren Vorteil der Kohlenstoffionentherapie gegenüber einer konventionellen Photonentherapie darstellen, unabhängig von den bereits bestehenden Vorteilen der Kohlenstoffionen in Bezug auf verstärkt induzierte DNA-Schäden. Nur durch Bestrahlung mit 9,8 MeV/u konnte die Produktion von NO in LPS-aktivierten Makrophagen bis zu 7-fach gesteigert werden. Nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen war dieser Effekt nicht zu beobachten. Es bleibt jedoch noch zu klären, ob dieser Effekt auch *in vivo* vorliegt. DiNapoli et al. (1996) und Klimp et al. (2001) konnten zeigen, dass in TAMs die Expression des iNOS-Gens und damit die NO-Produktion inhibiert ist. Es wird vermutet, dass dies durch dauerhafte Bildung eines NF-κB-Inhibitors, vermutlich das so genannte p50-Homodimer geschieht (Sica et al., 2007b). Gelänge es die TAMs zu einer dauerhaften und starken NO-Produktion anzuregen, könnte dies weitere Anti-Tumorthapien unterstützen.

5.6 Strahlensensitivität humaner B-Lymphozyten

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit der Strahlensensitivität primärer humaner B-Lymphozyten. Die B-Lymphozyten stellen als Antikörperproduzierende Zellen einen wichtigen Teil der Immunantwort dar, ca. 10 % der peripheren Lymphozyten sind B-Lymphozyten. Bisherige strahlenbiologische Untersuchungen an Lymphozyten erfolgten meist mit frisch isolierten, so genannten PBMCs (peripheral blood mononuclear cells). Diese enthalten sowohl T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, NK-Zellen und Monozyten. Diese wurden nach Bestrahlung mit einem T-Zell-Mitogen, meist Phytohämagglutinin (PHA), zur Proliferation angeregt. Nasonova & Ritter (2004), George et al. (2003) und Lee et al. (2005) konnten zeigen, dass die chromosomale Aberrationsrate in solchen heterogenen Lymphozytenkulturen nach Hoch-LET-Bestrahlung mit steigender Kultivierungszeit ansteigt. Als Grund für diese erhöhte Aberrationsrate werden sowohl Zellzyklusarrest-Effekte (George et al., 2001), als auch strahlensensitivere

Lymphozyten-Subpopulationen (Hoffmann et al., 2002; Hone et al., 2005) diskutiert.

Um zu klären, ob der Unterschied auf dem Vorhandensein von B-Lymphozyten beruht, wurde die chromosomale Aberrationsrate von B-Zellen nach Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen und 100 MeV/u Kohlenstoffionen untersucht. Die B-Zellen wurden gewählt, da sie nach den T-Zellen die zweit häufigste Lymphozytenpopulation darstellen und es in der Literatur Hinweise darauf gibt, dass B-Lymphozyten strahlensensitiver sind als T-Lymphozyten (Louagie et al., 1999 und Referenzen darin; Gridley et al., 2002a, 2002b; Vral et al., 2001; Miller et al., 1991; Wuttke et al., 1993).

Im Gegensatz zu diesen Arbeiten fanden Schwartz & Gaulden (1980), dass die Strahlensensitivität bezogen auf die chromosomale Aberrationsrate von B-Lymphozyten und T-Lymphozyten gleich ist. Schwartz & Gaulden verwendeten Pokeweed-Mitogen-stimulierte Lymphozytenkulturen, die nach Bestrahlung mittels Schafserythrozyten in eine B-Zell und T-Zell Fraktion geteilt wurden. Prinzipiell wurde in dieser Arbeit derselbe experimentelle Aufbau verwendet. Da die B-Zellen bei Stimulation mit Pokeweed-Mitogen (PWA) zusätzlich die Gegenwart von T-Helfer-Zellen zur Proliferation benötigen (siehe Wachstumskurven Abb. 4.1.4), wurden die B-Zellen erst nach Bestrahlung und Kultivierung von den unerwünschten T-Zellen abgetrennt.

5.6.1 Chromosomale Aberrationen nach Bestrahlung

Primäre, humane B-Lymphozyten zeigten nach Bestrahlung mit 250 kV Röntgenstrahlen die gleiche Art und Häufigkeit der strahleninduzierten Chromosomenschäden wie T-Lymphozyten. Dieses Ergebnis stimmt mit dem von Schwartz & Gaulden (1980) überein, allerdings verwendeten die Autoren nicht 250 kV Röntgenstrahlen sondern Co^{60} Gammastrahlen. Da sowohl die in dieser Arbeit verwendeten Röntgenstrahlen als auch die von Schwartz & Gaulden verwendeten Gammastrahlen Low-LET-Strahlen sind, sind die Ergebnisse vergleichbar. Im Unterschied zu der oben genannten Arbeit ist die Reinheit der isolierten B-Lymphozyten in der vorgelegten Arbeit hoch, der Anteil an störenden T-Lymphozyten betrug maximal 8 %. Da der Mitoseindex von Pokeweed-stimulierten B- und T-Lymphozyten gleich ist, kann davon ausgegangen werden, dass max. 8 % der untersuchten Metaphasen T-Zell Metaphasen waren.

In der Literatur wurden keine Arbeiten über chromosomale Aberrationsraten von B-Lymphozyten nach Hoch-LET-Bestrahlung gefunden. Diese Arbeit befasst sich erstmals mit der Bestimmung der Art und Häufigkeit von Chromosomenschäden in B-Lymphozyten nach Bestrahlung mit 100 MeV/u Kohlenstoffionen. Ebenso wie nach Röntgenbestrahlung wurden auch nach Kohlenstoffionenbestrahlung keine signifikanten Unterschiede in der Aberrationsrate zwischen B- und T-Lymphozyten gefunden.

Nasonova & Ritter (2004), Lee et al. (2005) und Manti et al. (2006) wiesen in ihren Arbeiten nach, dass die Menge und Art von Chromosomenschäden in Lymphozyten nach Hoch-LET-Bestrahlung von der Kultivierungszeit abhängig ist. Je länger die

Lymphozyten in Kultur gehalten wurden desto mehr chromosomale Aberrationen wurden in den Metaphasen gefunden, die sich in der 1. Mitose nach Bestrahlung befanden. Als Grund für die erhöhte Aberrationsrate wurden sowohl verstärkte Zellzyklusarreste, als auch strahlensensitivere Lymphozyten-Subtypen diskutiert. Um zu klären, ob der Effekt durch sensitive Lymphozyten-Subtypen hervorgerufen wird, wurde in der vorliegenden Arbeit die Strahlensensitivität von B-Lymphozyten untersucht. Die B-Lymphozyten stellen nach den T-Lymphozyten die zweit häufigste Lymphozytenpopulation dar. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Aberrationsrate von B-Lymphozyten und T-Lymphozyten gleich ist. Der von den oben genannten Autoren gefundene Anstieg der Aberrationsrate liegt somit nicht in einer strahlensensitiveren Lymphozyten-Subpopulation begründet. Vral et al. (1998a, 1998b, 2001) fanden bei Untersuchungen zur Mikrokern-Induktion in B-Lymphozyten heraus, dass diese mehr Mikrokerne nach Bestrahlung mit Gammastrahlen ausbilden als T-Lymphozyten. Allerdings zeigten sich die Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen nur im Dosisbereich unter 1 Gy. Ab einer applizierten Dosis von 1 Gy oder mehr war kein Unterschied in der Mikrokerninduktion zwischen B- und T-Lymphozyten nachweisbar. Da die in dieser Arbeit verwendeten Dosen nicht unter 1 Gy lagen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass B-Lymphozyten in diesem Niedrig-Dosisbereich ebenfalls eine erhöhte chromosomale Aberrationsrate aufweisen. Vral et al. schlussfolgerten, dass Mikrokerninduktion in B-Lymphozyten eine verbesserte biologische Dosimetrie bei kleinen Dosen (unter 1 Gy) erlauben.

5.6.2 Mitoseindex und Stimulierung von B-Lymphozyten

Neben der chromosomalen Aberrationsrate gibt der Mitoseindex, der Anteil an 1. Mitosen nach Bestrahlung und die Stimulierbarkeit Auskunft über die Strahlenempfindlichkeit humaner B-Zellen. Wie in Abbildung 4.7.7. zu sehen, ist kein klarer Trend in der Verteilung der 1. Metaphase nach Bestrahlung zu erkennen. Der Anteil an Metaphasen in der 1. Mitose sollte mit steigender Dosis ansteigen (Lee et al., 2005). Wahrscheinlich war die Anzahl der durchgeführten B-Zell-Experimente nicht groß genug, um einen statistisch signifikante Änderung zu erkennen. Ein anderer Grund liegt in den ständig wechselnden Blutspendern. Bei den hier gezeigten B-Zell-Experimenten wurde als Ausgangsmaterial Buffy-Coats aus der Blutspendebank in Frankfurt verwendet. Deshalb war es unmöglich, Zellen desselben Spender mehrmals zu erhalten.

In Abbildung 4.7.6 ist die Stimulierbarkeit von Lymphozyten nach Bestrahlung zu sehen. Es zeigte sich, dass sowohl die unbestrahlten, als auch die mit 1 Gy bestrahlten Proben große Unterschiede in der Anzahl stimulierter Zellen aufweisen. Erst nach einer Dosis von 2 Gy sind die Zellen gegenüber der Kontrolle weniger aktiviert. Dies zeigt, dass die Aktivierung mit Pokeweed-Mitogen die Zellen der jeweiligen Spender nicht einheitlich verläuft. Eine Aussage über die Strahlenempfindlichkeit von B-Zellen kann aufgrund der Anzahl an 1. Mitosen, bzw. aktivierten Zellen nach Bestrahlung nicht getroffen werden.

5.6.3 Schwester-Chromatid-Austausche (SCE)

Schwester-Chromatid-Austausche (Sister-Chromatid-Exchanges; SCE) dienen als Marker bei Untersuchungen zur Mutagenität von Chemikalien. SCEs wurden ebenfalls als Marker für strahleninduzierte DNA-Schäden benutzt (Aghamohammadi et al., 1988, 1989; Bozkurt et al., 2003; Schmid et al., 1996; Geard 1993).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass in B-Lymphozyten keine strahlenbedingte Änderung in der SCE-Rate nach Bestrahlung mit 100 MeV/u Kohlenstoffionen oder 250 kV Röntgenstrahlen vorliegt. Als Vergleich dienten Daten zu T-Lymphozyten, die von der Arbeitsgruppe Ritter zuvor erstellt wurden. Aghamohammadi et al (1989) wiesen einen leichten, aber dennoch signifikanten Anstieg in der SCE-Rate in G₀-Lymphozyte nach Bestrahlung mit 24 keV Neutronen nach. Weiterhin konnten Schmid et al (1996) einen deutlichen, linearen, dosisabhängigen Anstieg der SCE-Rate in PHA-stimulierten Lymphozyten nach Bestrahlung mit ²⁴¹Am-Alphastrahlen nachweisen. Dem entgegen stehen die Ergebnisse von Littlefield et al. (1979), Morgan & Crossen (1980) und Chaudhuri et al. (1982), die keinen signifikanten Anstieg der SCE-Ereignisse nach Bestrahlung feststellen konnten. Diese Autoren benutzten jedoch entweder Röntgen- oder Gammastrahlen. Die Unterschiede in den Ergebnissen der genannten Autoren beruhten möglicherweise auf der gewählten Strahlenqualität bzw. den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen.

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch auch nach Bestrahlung mit 100 MeV/u Kohlenstoffionen kein signifikanter Anstieg der SCE-Rate gemessen werden. Tendenziell lagen jedoch alle SCE-Raten der B-Lymphozyten unter denen der T-Lymphozyten. Es ist möglich, dass durch die relativ geringe Anzahl an Experimenten mit humanen B-Lymphozyten ein eventuell vorliegender Effekt der Hoch-LET-Strahlung auf die SCE-Rate nicht erfasst wurde. Dennoch ist festzuhalten, dass die Messung der SCEs nach Bestrahlung kein geeigneter Marker für eine biologische Dosimetrie darstellt, da die Streuung der SCE-Rate schon in unbestrahlten Kontrollen sehr groß ist (siehe Abbildung 4.7.5). Die Daten für T-Zellen aus der Arbeitsgruppe Ritter (GSI) zeigen weiterhin, dass die SCE-Raten nach Röntgen- und Kohlenstoffionenbestrahlung ebenfalls nicht dosisabhängig ansteigt, bzw. der gemessene Anstieg nicht signifikant ist (Abbildung 4.7.5).

5.6.4 B-Lymphozyten in PHA-stimulierten Kulturen

Humane Lymphozyten werden häufig als biologisches Dosimeter verwendet. Als biologischer Endpunkt wird unter anderem die Rate und Art der induzierten Chromosomenaberrationen verwendet. Für die Bestimmung wurde ein Standardprotokoll entwickelt (IAEA, 2001), damit weltweit dieselben Labor- und Kultivierungsbedingungen vorliegen und die Ergebnisse somit vergleichbar sind. Standardmäßig werden die Lymphozyten für 48 h nach Bestrahlung in Kultur gehalten und gleichzeitig mit Phytohämagglutinin stimuliert, damit die

Lymphozyten in den Zellzyklus eintreten und Metaphasen durch Zugabe von Colcemid am Ende der Kultivierungszeit angereichert werden können.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass humane Lymphozyten die gleiche chromosomale Aberrationsrate aufweisen wie T-Lymphozyten. Es wurde jedoch kein Phytohämagglutinin (PHA) verwendet wie im IAEA-Protokoll vorgeschlagen, da PHA hauptsächlich T-Lymphozyten stimulieren sollte (Greaves et al., 1972b; Wuttke et al., 1993). Stattdessen wurde das klassische B-Zell-Mitogen Pokeweed-Mitogen (PWA) verwendet. Um zu klären, ob die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse überhaupt vergleichbar sind mit Ergebnissen, die mit PHA-stimulierten Zellen durchgeführt wurden, wurde der Anteil an proliferierenden B-Zellen in PHA-stimulierten Lymphozytenkulturen bestimmt. Wie in den Abbildungen 4.7.8 und 4.7.10 zu sehen, bleibt der Anteil an B-Lymphozyten in Röntgen- oder Kohlenstoffionen-bestrahlten Lymphozytenkulturen gleich, bzw. steigt sogar mit zunehmender Kultivierungszeit an. Die Ergebnisse in Abbildungen 4.7.11 (A) und (B) zeigen klar, dass bis zu 25 % aller Mitosen in der Kultur B-Zell-Mitosen sind. Dadurch wird deutlich, dass B-Lymphozyten auch in PHA-stimulierten, gemischten Lymphozytenkulturen proliferieren. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Knuutila et al. (1987) und Kovanen & Knuutila (1989) überein. Dies bedeutet, dass B-Zell-Aberrationen bei früheren Untersuchungen der chromosomalen Aberrationsrate in PHA-stimulierten Lymphozytenkulturen immer mit erfasst wurden.

In zukünftigen strahlenbiologischen Untersuchungen mit PHA-stimulierten Lymphozytenkulturen muss daher der Fakt mit berücksichtigt werden, dass mindestens zwei unterschiedliche Zelltypen proliferieren (T- und B-Zellen) und je nach gewähltem biologischem Endpunkt die Reaktionen dieser beiden Zelltypen unterschiedlich ausfallen können. Vral et al. (2001) zeigten bereits, dass B- und T-Lymphozyten unterschiedliche Mikrokern-Raten nach Bestrahlung ausweisen, zumindest im Dosisbereich unter 1 Gy.

5.6.5 Apoptoseraten von B- und T-Lymphozyten

Neben der chromosomalen Aberrationsrate gibt die Apoptoserate von Lymphozyten Hinweise auf die Strahlensensitivität. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass B-Lymphozyten sowohl nach Bestrahlung mit Röntgen- als auch mit Kohlenstoffionenstrahlen eine höhere Apoptoserate aufweisen als T-Lymphozyten (siehe Kapitel 4.7.9 und 4.7.11). Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Schmitz et al. (2003; 2007), Phillipé et al (1997) überein. Diese Autoren untersuchten die Apoptoseraten humaner Lymphozyten-Subpopulationen nach Bestrahlung mit 0 – 2 Gy Gammastrahlen. B-Lymphozyten wiesen dosisabhängig die höchste Apoptoserate auf, gefolgt von den sogenannten CD8-cytotoxischen-T-Zellen und CD4-Helfer-T-Zellen. Die geringste Apoptoserate war bei NK-Zellen zu finden. Festzuhalten bleibt, dass B-Lymphozyten eine höhere Strahlensensitivität als T-Lymphozyten haben, wenn als biologischer Endpunkt die Apoptoserate herangezogen wird, jedoch nicht bei der Betrachtung der chromosomalen Aberrationsrate.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass B-Zellen nicht nur nach Bestrahlung vermehrt der Apoptose unterliegen. Auch unbestrahlte, PHA-stimulierte B-Zellen weisen eine höhere Apoptoserate auf, allerdings erst nach 72 h Kultivierungszeit. Clave et al. (1995), Louagie et al. (1999) und Bachtiary et al. (2005) wiesen nach, dass in Patienten, die einer Strahlentherapie unterzogen wurden, die Anzahl der B-Zellen im Blut am deutlichsten abnahm. Dies steht mit der hier gezeigten erhöhten Apoptoserate der B-Zellen im Einklang. Bachtiary et al. (2005) weisen weiterhin nach, dass die Anzahl der B-Zellen im Blut am schnellsten nach Beendigung der Strahlentherapie anstieg. Dieses Ergebnis, zusammen mit der Tatsache, dass B-Zellen auch *in vitro* unter Einfluss von PHA-Stimulation proliferieren (siehe Abbildung 4.7.11 (A)), zeigt dass der B-Zellen-Anteil in einer Lymphozytenkultur relativ schnell nach einer Schädigung wieder ansteigen kann, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. Dies wurde auch von Kusunoki et al. (1998) festgestellt, der die Verhältnisse der verschiedenen Lymphozyten-Subpopulationen in Überlebenden der Atombombenexplosionen in Japan bestimmt hat. Während der Anteil an CD4-Helfer-T-Zellen deutlich niedriger lag als die der Kontrollgruppen, war der B-Zell Anteil sogar erhöht.

B-Zell-Leukämien sind die häufigsten Leukämien bei Kindern und Erwachsenen, nur in ca. 15 % der Leukämiefällen stammen die entarteten Zellen von T-Zellen ab (van Zutven et al., 2005). Obwohl B-Zellen nur ca. 10 % der peripheren Lymphozyten ausmachen, sind sie überproportional häufig für akute Leukämien verantwortlich. Da chromosomale Aberrationen vielfach Auslöser von Leukämien sind, ist es wichtig, die Auswirkungen von Strahlentherapien auf die Art und Häufigkeit von strahleninduzierten Veränderungen der Chromosomen zu kennen, besonders im Hinblick auf pädiatrische Patienten und mögliche Spätfolgen. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass B-Zellen keiner verstärkten chromosomalen Aberrationsrate nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen oder Kohlenstoffionen unterliegen, im Vergleich zu T-Zellen. Somit ist nicht davon auszugehen, dass eine Kohlenstoffionentherapie risikoreicher ist als eine vergleichbare, konventionelle Strahlentherapie mit Photonen, im Hinblick auf strahleninduzierte lymphatische Leukämien als Spätfolge der Behandlung.

5.7 Zusammenfassung / Aussichten Teil 2: Humane B-Lymphozyten

Humane Lymphozyten werden in der Strahlenbiologie häufig als biologisches Dosimeter verwendet. Als biologischer Endpunkt wird dazu die chromosomale Aberrationsrate herangezogen, da die Chromosomenschäden relativ leicht mit Hilfe von Metaphasepräparaten sichtbar gemacht werden können und auch noch bei applizierten Dosen unter 0,1 Gy erkannt werden können. Bisherige Untersuchungen mit peripheren Blutlymphozyten ließen die Tatsache außer acht, dass Lymphozyten eine extrem heterogene Gruppe von Blutzellen sind. Es konnte gezeigt werden, dass Lymphozyten, die mit Hoch-LET-Strahlen bestrahlt wurden, mit steigender Kultivierungszeit mehr Chromosomenaberrationen aufweisen (Nasonova et al., 2004). Es sollte geklärt werden, ob dieser Anstieg durch eine strahlensensitivere

Lymphozyten-Subpopulation hervorgerufen wird. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass B-Lymphozyten die gleiche chromosomale Aberrationsrate aufweisen wie T-Lymphozyten, sowohl nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen als auch mit 100 MeV/u Kohlenstoffionen. Die Kohlenstoffionenstrahlen induzierten Chromosomenaberrationen effektiver als Röntgenstrahlen; der RBW_{100} lag bei 2,5 und der RBW_{200} bei 1,9.

Um zu klären, ob die hier gezeigten Ergebnisse mit bestehenden vergleichbar sind wurde untersucht, ob die B-Zellen in Lymphozytenkulturen, die nach dem Standardprotokoll (IAEA, 2001) isoliert und kultiviert wurden, überhaupt proliferieren und somit auf Metaphasepräparaten sichtbar sind. Es konnte nachgewiesen werden, dass B-Zellen tatsächlich unter Standardbedingungen proliferieren und somit stets B-Zell-Mitosen auf Chromosomenpräparaten vorhanden sind. Der Anstieg der Aberrationsrate mit zunehmender Kultivierungszeit kann nicht durch eine strahlensensitive Lymphozyten-Subpopulation erklärt werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass die untersuchten B-Lymphozyten gegenüber T-Lymphozyten auch keine erhöhte SCE-Rate aufweisen. Lediglich in der Apoptoserate zeigen sich Unterschiede zwischen B- und T-Lymphozyten. Sowohl unbestrahlte als auch bestrahlte B-Zellen weisen eine höhere Apoptoserate im Vergleich zu T-Zellen auf.

Im Hinblick auf zukünftige Strahlentherapien mit Kohlenstoffionen lässt sich aufgrund der vorliegenden Arbeit auf kein höheres Risiko der Kohlenstoffionenstrahlen schließen. Sowohl T- als auch B-Zellen zeigen dieselbe Strahlensensitivität, bezogen auf die chromosomale Aberrationsrate.

6. Literaturliste

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., & Pober, J.S 1997, *Cellular and molecular immunology*, 3. Edition, Harcourt Brace & Company, Philadelphia.
- Abbas, A. K. 2003, "The control of T cell activation vs. tolerance", *Autoimmun. Rev.*, vol. 2, no. 3, pp. 115-118.
- Aghamohammadi, S. Z., Goodhead, D. T., & Savage, J. R. 1988, "Induction of sister chromatid exchanges (SCE) in G0 lymphocytes by plutonium-238 alpha-particles", *Int.J Radiat.Biol.Relat Stud.Phys Chem.Med.* , vol. 53, no. 6, pp. 909-915.
- Aghamohammadi, S. Z., Goodhead, D. T., & Savage, J. R. 1989, "Production of chromosome aberrations, micronuclei, and sister-chromatid exchanges by 24-keV epithermal neutrons in human G0 lymphocytes", *Mutat.Res.*, vol. 211, no. 2, pp. 225-230.
- Anderson, R. M., Marsden, S. J., Wright, E. G., Kadhim, M. A., Goodhead, D. T., & Griffin, C. S. 2000, "Complex chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes as a potential biomarker of exposure to high-LET alpha-particles", *Int.J.Radiat.Biol.*, vol. 76, no. 1, pp. 31-42.
- Andreev, S. G., Eidelman, Y. A., Salnikov, I. V., & Khvostunov, I. K. 2006, "Mechanistic modelling of genetic and epigenetic events in radiation carcinogenesis", *Radiat.Prot.Dosimetry.*, vol. 122, no. 1-4, pp. 335-339.
- Auron, P. E., Webb, A. C., Rosenwasser, L. J., Mucci, S. F., Rich, A., Wolff, S. M., & Dinarello, C. A. 1984, "Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA", *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* , vol. 81, no. 24, pp. 7907-7911.
- Bachtiary, B., Herbacek, I., Zideck, T., Knocke, T. H., Dimopoulos, J., Poetter, R., & Micksche, M. 2005, "Impact of radiotherapy with and without concurrent cisplatin on lymphocyte subpopulations in cervical cancer patients", *Anticancer Res.*, vol. 25, no. 6C, pp. 4673-4678.
- Bingle, L., Brown, N. J., & Lewis, C. E. 2002, "The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies", *J Pathol.*, vol. 196, no. 3, pp. 254-265.
- BOYUM, A. 1964, "SEPARATION OF WHITE BLOOD CELLS", *Nature*, vol. 204, pp. 793-794.
- Bozkurt, G., Yuksel, M., Karabogaz, G., Sut, N., Savran, F. O., Palanduz, S., Yigitbasi, O. N., & Algunes, C. 2003, "Sister chromatid exchanges in lymphocytes of nuclear medicine physicians", *Mutat.Res.*, vol. 535, no. 2, pp. 205-213.
- Bredt, D. S. & Snyder, S. H. 1994, "Nitric oxide: a physiologic messenger molecule", *Annu.Rev.Biochem.*, vol. 63, pp. 175-195.
- Brenner, D. J., Doll, R., Goodhead, D. T., Hall, E. J., Land, C. E., Little, J. B., Lubin, J. H., Preston, D. L., Preston, R. J., Puskin, J. S., Ron, E., Sachs, R. K., Samet, J. M., Setlow, R. B., & Zaider, M. 2003, "Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 100, no. 24, pp. 13761-13766.
- Burke, B., Giannoudis, A., Corke, K. P., Gill, D., Wells, M., Ziegler-Heitbrock, L., & Lewis, C. E. 2003, "Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy", *Am.J Pathol.*, vol. 163, no. 4, pp. 1233-1243.

Kapitel 6: Literaturliste

- Chaudhuri, J. P. 1982, "A schedule to demonstrate radiation-induced sister chromatid exchanges in human lymphocytes", *Radiat. Environ. Biophys.*, vol. 20, no. 3, pp. 223-229.
- Chen, Y., Williams, J., Ding, I., Hernady, E., Liu, W., Smudzin, T., Finkelstein, J. N., Rubin, P., & Okunieff, P. 2002, "Radiation pneumonitis and early circulatory cytokine markers", *Semin. Radiat. Oncol.*, vol. 12, no. 1 Suppl 1, pp. 26-33.
- Clave, E., Socie, G., Cosset, J. M., Chaillet, M. P., Tartour, E., Girinsky, T., Carosella, E., Fridman, H., Gluckman, E., & Mathiot, C. 1995, "Multicolor flow cytometry analysis of blood cell subsets in patients given total body irradiation before bone marrow transplantation", *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 33, no. 4, pp. 881-886.
- Cole, A. T., Slater, K., Sokal, M., & Hawkey, C. J. 1993, "In vivo rectal inflammatory mediator changes with radiotherapy to the pelvis", *Gut*, vol. 34, no. 9, pp. 1210-1214.
- Cologne, J. B. & Preston, D. L. 2000, "Longevity of atomic-bomb survivors", *Lancet*, vol. 356, no. 9226, pp. 303-307.
- Cornforth, M. N. 2006, "Perspectives on the formation of radiation-induced exchange aberrations", *DNA Repair (Amst)*, vol. 5, no. 9-10, pp. 1182-1191.
- Cucinotta, F. A., Wu, H., Shavers, M. R., & George, K. 2003, "Radiation dosimetry and biophysical models of space radiation effects", *Gravit. Space Biol. Bull.*, vol. 16, no. 2, pp. 11-18.
- De, S. M., Luzi, S., Errico, A., Frascino, V., Mangiacotti, M. G., Picardi, V., & Morganti, A. G. 2005, "Impact of dose and volume on subcutaneous fibrosis", *Rays*, vol. 30, no. 2, pp. 169-173.
- Deetjen P, Falkenbach A, Harder D, , J. H., Kaul A, & Philipsborn H 2005, *Radon als Heilmittel* Verlag Kovac.
- Didelot, C., Barberi-Heyob, M., Bianchi, A., Becuwe, P., Mirjolet, J. F., Dauca, M., & Merlin, J. L. 2001, "Constitutive NF-kappaB activity influences basal apoptosis and radiosensitivity of head-and-neck carcinoma cell lines", *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 51, no. 5, pp. 1354-1360.
- Dinapoli, M. R., Calderon, C. L., & Lopez, D. M. 1996, "The altered tumoricidal capacity of macrophages isolated from tumor-bearing mice is related to reduce expression of the inducible nitric oxide synthase gene", *J. Exp. Med.*, vol. 183, no. 4, pp. 1323-1329.
- Dinarello, C. A. 1991, "The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome", *J. Infect. Dis.*, vol. 163, no. 6, pp. 1177-1184.
- Edelson, P. J. & Cohn, Z. A. 1974, "Effects of concanavalin A on mouse peritoneal macrophages. I. Stimulation of endocytic activity and inhibition of phago-lysosome formation", *J. Exp. Med.*, vol. 140, no. 5, pp. 1364-1386.
- Eidelman, Y. A., Ritter, S., Nasonova, E., Lee, R., Talyzina, T. A., & Andreev, S. G. 2006, "Prediction of dose response for radiation induced exchange aberrations taking cell cycle delays into account", *Radiat. Prot. Dosimetry.*, vol. 122, no. 1-4, pp. 185-187.
- Epperly, M. W., Gretton, J. E., Sikora, C. A., Jefferson, M., Bernarding, M., Nie, S., & Greenberger, J. S. 2003, "Mitochondrial localization of superoxide dismutase is required for decreasing radiation-induced cellular damage", *Radiat. Res.*, vol. 160, no. 5, pp. 568-578.
- Epperly, M. W., Bernarding, M., Gretton, J., Jefferson, M., Nie, S., & Greenberger, J. S. 2003a, "Overexpression of the transgene for manganese superoxide dismutase (MnSOD) in 32D cl 3

Kapitel 6: Literaturliste

cells prevents apoptosis induction by TNF-alpha, IL-3 withdrawal, and ionizing radiation", *Exp.Hematol.*, vol. 31, no. 6, pp. 465-474.

- Epperly, M. W., Guo, H. L., Jefferson, M., Nie, S., Gretton, J., Bernarding, M., Bar-Sagi, D., Archer, H., & Greenberger, J. S. 2003b, "Cell phenotype specific kinetics of expression of intratracheally injected manganese superoxide dismutase-plasmid/liposomes (MnSOD-PL) during lung radioprotective gene therapy", *Gene Ther.*, vol. 10, no. 2, pp. 163-171.
- Epperly, M. W., Tyurina, Y. Y., Nie, S., Niu, Y. Y., Zhang, X., Kagan, V., & Greenberger, J. S. 2005, "MnSOD-plasmid liposome gene therapy decreases ionizing irradiation-induced lipid peroxidation of the esophagus", *In Vivo*, vol. 19, no. 6, pp. 997-1004.
- Epperly, M. W., Franicola, D., Zhang, X., Nie, S., & Greenberger, J. S. 2006, "Effect of EGFR antagonists gefitinib (Iressa) and C225 (Cetuximab) on MnSOD-plasmid liposome transgene radiosensitization of a murine squamous cell carcinoma cell line", *In Vivo*, vol. 20, no. 6B, pp. 791-796.
- Epperly, M. W., Wegner, R., Kanai, A. J., Kagan, V., Greenberger, E. E., Nie, S., & Greenberger, J. S. 2007a, "Effects of MnSOD-plasmid liposome gene therapy on antioxidant levels in irradiated murine oral cavity orthotopic tumors", *Radiat.Res.*, vol. 167, no. 3, pp. 289-297.
- Epperly, M. W., Cao, S., Zhang, X., Franicola, D., Shen, H., Greenberger, E. E., Epperly, L. D., & Greenberger, J. S. 2007b, "Increased longevity of hematopoiesis in continuous bone marrow cultures derived from NOS1 (nNOS, mtNOS) homozygous recombinant negative mice correlates with radioresistance of hematopoietic and marrow stromal cells", *Exp.Hematol.*, vol. 35, no. 1, pp. 137-145.
- Evans, H. J. & O'Riordan, M. L. 1975, "Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests", *Mutat.Res.*, vol. 31, no. 3, pp. 135-148.
- Finkelstein, J. N., Johnston, C. J., Baggs, R., & Rubin, P. 1994, "Early alterations in extracellular matrix and transforming growth factor beta gene expression in mouse lung indicative of late radiation fibrosis", *Int.J Radiat.Oncol.Biol.Phys*, vol. 28, no. 3, pp. 621-631.
- Foley, E. & O'Farrell, P. H. 2003, "Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*", *Genes Dev.*, vol. 17, no. 1, pp. 115-125.
- Forman, H. J. & Torres, M. 2001, "Signaling by the respiratory burst in macrophages", *IUBMB.Life*, vol. 51, no. 6, pp. 365-371.
- Forman, H. J. & Torres, M. 2001, "Redox signaling in macrophages", *Mol.Aspects Med.*, vol. 22, no. 4-5, pp. 189-216.
- Forstermann, U. & Kleinert, H. 1995, "Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms", *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.*, vol. 352, no. 4, pp. 351-364.
- Geard, C. R. 1993, "Induction of sister chromatid exchange as a function of charged-particle linear energy transfer", *Radiat.Res.*, vol. 134, no. 2, pp. 187-192.
- George, K., Durante, M., Wu, H., Willingham, V., Badhwar, G., & Cucinotta, F. A. 2001, "Chromosome aberrations in the blood lymphocytes of astronauts after space flight", *Radiat.Res.*, vol. 156, no. 6, pp. 731-738.
- Gessani, S., Testa, U., Varano, B., Di, M. P., Borghi, P., Conti, L., Barberi, T., Tritarelli, E., Martucci, R., Seripa, D., & . 1993, "Enhanced production of LPS-induced cytokines during differentiation of

- human monocytes to macrophages. Role of LPS receptors", *J Immunol.*, vol. 151, no. 7, pp. 3758-3766.
- Girinsky, T. & Cosset, J. M. 1997, "[Pulmonary and cardiac late effects of ionizing radiations alone or combined with chemotherapy]", *Cancer Radiother.*, vol. 1, no. 6, pp. 735-743.
- Gmeiner, J. 1975, "The isolation of two different lipopolysaccharide fractions from various *Proteus mirabilis* strains", *Eur.J.Biochem.*, vol. 58, no. 2, pp. 621-626.
- Goswami, S., Sahai, E., Wyckoff, J. B., Cammer, M., Cox, D., Pixley, F. J., Stanley, E. R., Segall, J. E., & Condeelis, J. S. 2005, "Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop", *Cancer Res.*, vol. 65, no. 12, pp. 5278-5283.
- Gray, J. G., Chandra, G., Clay, W. C., Stinnett, S. W., Haneline, S. A., Lorenz, J. J., Patel, I. R., Wisely, G. B., Furdon, P. J., Taylor, J. D., & . 1993, "A CRE/ATF-like site in the upstream regulatory sequence of the human interleukin 1 beta gene is necessary for induction in U937 and THP-1 monocytic cell lines", *Mol.Cell Biol.*, vol. 13, no. 11, pp. 6678-6689.
- Greaves, M. F., Bauminger, S., & Janossy, G. 1972, "Lymphocyte activation. 3. Binding sites for phytomitogens on lymphocyte subpopulations", *Clin.Exp.Immunol.*, vol. 10, no. 3, pp. 537-554.
- Greaves, M. F. & Bauminger, S. 1972, "Activation of T and B lymphocytes by insoluble phytomitogens", *Nat.New Biol.*, vol. 235, no. 55, pp. 67-70.
- Greenberger, J. S. & Epperly, M. W. 2007, "Review. Antioxidant gene therapeutic approaches to normal tissue radioprotection and tumor radiosensitization", *In Vivo*, vol. 21, no. 2, pp. 141-146.
- Gridley, D. S., Lored, L. N., Slater, J. D., Archambeau, J. O., Bedros, A. A., Andres, M. L., & Slater, J. M. 1998, "Pilot evaluation of cytokine levels in patients undergoing radiotherapy for brain tumor", *Cancer Detect.Prev.*, vol. 22, no. 1, pp. 20-29.
- Gridley, D. S., Pecaut, M. J., Dutta-Roy, R., & Nelson, G. A. 2002, "Dose and dose rate effects of whole-body proton irradiation on leukocyte populations and lymphoid organs: part I", *Immunol.Lett.*, vol. 80, no. 1, pp. 55-66.
- Gridley, D. S., Bonnet, R. B., Bush, D. A., Franke, C., Cheek, G. A., Slater, J. D., & Slater, J. M. 2004, "Time course of serum cytokines in patients receiving proton or combined photon/proton beam radiation for resectable but medically inoperable non-small-cell lung cancer", *Int.J Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, vol. 60, no. 3, pp. 759-766.
- Gridley, D. S. & Pecaut, M. J. 2006, "Whole-body irradiation and long-term modification of bone marrow-derived cell populations by low- and high-LET radiation", *In Vivo*, vol. 20, no. 6B, pp. 781-789.
- Griffin, C. S., Marsden, S. J., Stevens, D. L., Simpson, P., & Savage, J. R. 1995, "Frequencies of complex chromosome exchange aberrations induced by ²³⁸Pu alpha-particles and detected by fluorescence in situ hybridization using single chromosome-specific probes", *Int.J.Radiat.Biol.*, vol. 67, no. 4, pp. 431-439.
- Grisham, M. B., Johnson, G. G., & Lancaster, J. R., Jr. 1996, "Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids", *Methods Enzymol.*, vol. 268, pp. 237-246.
- Haase, O. & Rodemann, H. P. 2004, "Fibrosis and cytokine mechanisms: relevant in hadron therapy?", *Radiother.Oncol.*, vol. 73 Suppl 2, p. S144-S147.

Kapitel 6: Literaturliste

- Haberer, T., Becher, W., Schardt, D., & Kraft, G. 1993, "Magnetic scanning system for heavy ion therapy", *Nucl.Instr.Meth*, vol. A330, pp. 296-365.
- Hachiya, M., Shimizu, S., Osawa, Y., & Akashi, M. 1997, "Endogenous production of tumour necrosis factor is required for manganese superoxide dismutase expression by irradiation in the human monocytic cell line THP-1", *Biochem.J*, vol. 328 (Pt 2), pp. 615-623.
- Hakim, T. S., Sugimori, K., Camporesi, E. M., & Anderson, G. 1996, "Half-life of nitric oxide in aqueous solutions with and without haemoglobin", *Physiol Meas.*, vol. 17, no. 4, pp. 267-277.
- Hall, E. 2005, *Radiobiology for the Radiologist*, 6th edition edn, Lippincott Williams&Wilki.
- Hallahan, D. E., Virudachalam, S., Sherman, M. L., Huberman, E., Kufe, D. W., & Weichselbaum, R. R. 1991, "Tumor necrosis factor gene expression is mediated by protein kinase C following activation by ionizing radiation", *Cancer Res.*, vol. 51, no. 17, pp. 4565-4569.
- Heeg P., Hartmann G, Jäkel O, Karger C., & Kraft G. 1999, "Quality assurance at the heavy-ion therapy facility at GSI", *Strahlenther Onkol*, vol. 175(Suppl. 2).
- Heilmann, J., Taucher-Scholz, G., Haberer, T., Scholz, M., & Kraft, G. 1996, "Measurement of intracellular dna double-strand break induction and rejoining along the track of carbon and neon particle beams in water", *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, vol. 34, no. 3, pp. 599-608.
- Herskind, C., Bamberg, M., & Rodemann, H. P. 1998, "The role of cytokines in the development of normal-tissue reactions after radiotherapy", *Strahlenther Onkol*, vol. 174 Suppl 3, pp. 12-15.
- Herskind, C., Bentzen, S. M., Overgaard, J., Overgaard, M., Bamberg, M., & Rodemann, H. P. 1998, "Differentiation state of skin fibroblast cultures versus risk of subcutaneous fibrosis after radiotherapy", *Radiother.Oncol.*, vol. 47, no. 3, pp. 263-269.
- Hildebrandt, G., Seed, M. P., Freemantle, C. N., Alam, C. A., Colville-Nash, P. R., & Trott, K. R. 1998, "Mechanisms of the anti-inflammatory activity of low-dose radiation therapy", *Int.J.Radiat.Biol.*, vol. 74, no. 3, pp. 367-378.
- Hildebrandt, G., Radlingmayr, A., Rosenthal, S., Rothe, R., Jahns, J., Hindemith, M., Rodel, F., & Kamprad, F. 2003, "Low-dose radiotherapy (LD-RT) and the modulation of iNOS expression in adjuvant-induced arthritis in rats", *Int.J.Radiat.Biol.*, vol. 79, no. 12, pp. 993-1001.
- Hildebrandt, G., Loppnow, G., Jahns, J., Hindemith, M., Anderegg, U., Saalbach, A., & Kamprad, F. 2003, "Inhibition of the iNOS pathway in inflammatory macrophages by low-dose X-irradiation in vitro. Is there a time dependence?", *Strahlenther.Onkol.*, vol. 179, no. 3, pp. 158-166.
- Hirose, K., Longo, D. L., Oppenheim, J. J., & Matsushima, K. 1993, "Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase promotes the survival of tumor cells exposed to interleukin-1, tumor necrosis factor, selected anticancer drugs, and ionizing radiation", *FASEB J*, vol. 7, no. 2, pp. 361-368.
- Hoeijmakers, J. H. 2001, "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer", *Nature*, vol. 411, no. 6835, pp. 366-374.
- Hoffmann, G. R., Sayer, A. M., & Littlefield, L. G. 2002, "Higher frequency of chromosome aberrations in late-arising first-division metaphases than in early-arising metaphases after exposure of human lymphocytes to X-rays in G0", *Int.J.Radiat.Biol.*, vol. 78, no. 9, pp. 765-772.

Kapitel 6: Literaturliste

- Hone, P. A., Edwards, A. A., Lloyd, D. C., & Moquet, J. E. 2005, "The yield of radiation-induced chromosomal aberrations in first division human lymphocytes depends on the culture time", *Int.J.Radiat.Biol.*, vol. 81, no. 7, pp. 523-529.
- Hosoi, Y., Miyachi, H., Matsumoto, Y., Enomoto, A., Nakagawa, K., Suzuki, N., & Ono, T. 2001, "Induction of interleukin-1beta and interleukin-6 mRNA by low doses of ionizing radiation in macrophages", *Int.J Cancer*, vol. 96, no. 5, pp. 270-276.
- IAEA, 2. 2001, *Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. a manual. Tech. Rep. 405.*
- ICRU Report Nr.60 1998 1998, *ICRU Report Nr. 60: Fundamental Quantities and Units for Ionizing Radiation / International Commission on Radiation Units and Measurements (ICRU).*
- ISCN, 1978. An international system for human cytogenetic nomenclature (1978).Report of the Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. *CytogenetCell Genet* 21 (6), 309{409.
- Imamura, N. & Kimura, A. 2000, "Neutropenia among survivors of atomic bomb explosion", *Lancet*, vol. 355, no. 9198, p. 117.
- Iwamoto, K. S. & McBride, W. H. 1994, "Production of 13-hydroxyoctadecadienoic acid and tumor necrosis factor-alpha by murine peritoneal macrophages in response to irradiation", *Radiat.Res.*, vol. 139, no. 1, pp. 103-108.
- Jakel, O., Kramer, M., Schulz-Ertner, D., Heeg, P., Karger, C. P., Didinger, B., Nikoghosyan, A., & Debus, J. 2004, "Treatment planning for carbon ion radiotherapy in Germany: review of clinical trials and treatment planning studies", *Radiother.Oncol.*, vol. 73 Suppl 2, p. S86-S91.
- Jakel, O., Schulz-Ertner, D., & Debus, J. 2007, "Specifying carbon ion doses for radiotherapy: the heidelberg approach", *J Radiat.Res.(Tokyo)*, vol. 48 Suppl A, p. A87-A95.
- Janeway C, Travers P, Walport M, & Shlomchick 2002, *Immunologie* Spektrum Verlag.
- Janossy, G. & Greaves, M. F. 1972, "Lymphocyte activation. II. discriminating stimulation of lymphocyte subpopulations by phytomitogens and heterologous antilymphocyte sera", *Clin.Exp.Immunol.*, vol. 10, no. 3, pp. 525-536.
- Johnson, R. D. & Jasin, M. 2000, "Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells", *EMBO J*, vol. 19, no. 13, pp. 3398-3407.
- Johnston, C. J., Piedboeuf, B., Baggs, R., Rubin, P., & Finkelstein, J. N. 1995, "Differences in correlation of mRNA gene expression in mice sensitive and resistant to radiation-induced pulmonary fibrosis", *Radiat.Res.*, vol. 142, no. 2, pp. 197-203.
- Johnston, C. J., Piedboeuf, B., Rubin, P., Williams, J. P., Baggs, R., & Finkelstein, J. N. 1996, "Early and persistent alterations in the expression of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha mRNA levels in fibrosis-resistant and sensitive mice after thoracic irradiation", *Radiat.Res.*, vol. 145, no. 6, pp. 762-767.
- Johnston, C. J., Stripp, B. R., Piedbeouf, B., Wright, T. W., Mango, G. W., Reed, C. K., & Finkelstein, J. N. 1998, "Inflammatory and epithelial responses in mouse strains that differ in sensitivity to hyperoxic injury", *Exp.Lung Res.*, vol. 24, no. 2, pp. 189-202.

Kapitel 6: Literaturliste

- Kern, P. M., Keilholz, L., Forster, C., Hallmann, R., Herrmann, M., & Seegenschmiedt, M. H. 2000, "Low-dose radiotherapy selectively reduces adhesion of peripheral blood mononuclear cells to endothelium in vitro", *Radiother.Oncol.*, vol. 54, no. 3, pp. 273-282.
- Kiefer, J. 1989, *Biologische Strahlenwirkung* Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin.
- Klein, J. 1991, *Immunologie* VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Kleinert, H., Pautz, A., Linker, K., & Schwarz, P. M. 2004, "Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase", *Eur.J Pharmacol.*, vol. 500, no. 1-3, pp. 255-266.
- Klimp, A. H., Hollema, H., Kempinga, C., van der Zee, A. G., de Vries, E. G., & Daemen, T. 2001, "Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in human ovarian tumors and tumor-associated macrophages", *Cancer Res.*, vol. 61, no. 19, pp. 7305-7309.
- Knight, J. A. 2000, "Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system", *Ann.Clin.Lab Sci*, vol. 30, no. 2, pp. 145-158.
- Knuutila, S. & Kovanen, P. E. 1987, "Relative proportions of mitotic T and B cells in PHA-stimulated lymphocyte cultures", *Cancer Genet.Cytogenet.*, vol. 29, no. 1, pp. 151-154.
- Kovanen, P. E. & Knuutila, S. 1989, "Mitotic cells in different lymphocyte subsets in unfractionated cultures stimulated by phytohaemagglutinin or pokeweed mitogen", *Hereditas*, vol. 110, no. 1, pp. 69-74.
- Kraft, G. 1987, "Radiobiological Effects of Very Heavy Ions: Inactivation, Induction of Chromosome Aberrations and Strand Breaks", *Nucl.Sci.Appl*, vol. 3, pp. 1-28.
- Kraft, G. 2000, "Tumor therapy with heavy charged particles", *Prog Part Nucl Phys*, vol. 45 suppl.(2), pp. 473-544.
- Kraft, G., Blakely, E. A., Hieber, L., Kraft-Weyrather, W., Miltenburger, H. G., Muller, W., Schuber, M., Tobias, C. A., & Wulf, H. 1984, "HZE effects on mammalian cells", *Adv.Space Res.*, vol. 4, no. 10, pp. 219-226.
- Kraft, G., Kraft-Weyrather, W., Blakely, E. A., & Roots, R. 1986, "Heavy-ion effects on cellular and subcellular systems: inactivation, chromosome aberrations and strand breaks induced by iron and nickel ions", *Adv.Space Res.*, vol. 6, no. 11, pp. 127-136.
- Kraft, G., Kraft-Weyrather, W., Ritter, S., Scholz, M., & Stanton, J. 1989, "Cellular and subcellular effect of heavy ions: a comparison of the induction of strand breaks and chromosomal aberration with the incidence of inactivation and mutation", *Adv.Space Res.*, vol. 9, no. 10, pp. 59-72.
- Kraft, G. 1990, "The radiobiological and physical basis for radiotherapy with protons and heavier ions", *Strahlenther.Onkol.*, vol. 166, no. 1, pp. 10-13.
- Kraft, G., Kramer, M., & Scholz, M. 1992, "LET, track structure and models. A review", *Radiat.Environ.Biophys.*, vol. 31, no. 3, pp. 161-180.
- Kraft, G. 1998, "Radiotherapy with heavy ions: radiobiology, clinical indications and experience at GSI, Darmstadt", *Tumori*, vol. 84, no. 2, pp. 200-204.
- Kramer, M. & Kraft, G. 1994, "Track structure and DNA damage", *Adv.Space Res.*, vol. 14, no. 10, pp. 151-159.

Kapitel 6: Literaturliste

- Kusunoki, Y., Kodama, Y., Hirai, Y., Kyoizumi, S., Nakamura, N., & Akiyama, M. 1995, "Cytogenetic and immunologic identification of clonal expansion of stem cells into T and B lymphocytes in one Atomic-bomb survivor", *Blood*, vol. 86, no. 6, pp. 2106-2112.
- Kusunoki, Y., Kyoizumi, S., Hirai, Y., Suzuki, T., Nakashima, E., Kodama, K., & Seyama, T. 1998, "Flow cytometry measurements of subsets of T, B and NK cells in peripheral blood lymphocytes of atomic bomb survivors", *Radiat.Res.*, vol. 150, no. 2, pp. 227-236.
- Kusunoki, Y., Yamaoka, M., Kasagi, F., Hayashi, T., Koyama, K., Kodama, K., MacPhee, D. G., & Kyoizumi, S. 2002, "T cells of atomic bomb survivors respond poorly to stimulation by *Staphylococcus aureus* toxins in vitro: does this stem from their peripheral lymphocyte populations having a diminished naive CD4 T-cell content?", *Radiat.Res.*, vol. 158, no. 6, pp. 715-724.
- Kusunoki, Y. & Hayashi, T. 2007, "Long-lasting alterations of the immune system by ionizing radiation exposure: Implications for disease development among atomic bomb survivors", *Int.J Radiat.Biol.* pp. 1-14.
- Land, C. E., Tokunaga, M., Koyama, K., Soda, M., Preston, D. L., Nishimori, I., & Tokuoka, S. 2003, "Incidence of female breast cancer among atomic bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki, 1950-1990", *Radiat.Res.*, vol. 160, no. 6, pp. 707-717.
- Lee, R., Nasonova, E., & Ritter, S. 2005, "Chromosome aberration yields and apoptosis in human lymphocytes irradiated with Fe-ions of differing LET", *Adv.Space Res.*, vol. 35, no. 2, pp. 268-275.
- Lee, R. 2006, *Chromosome Aberrations in human lymphocytes irradiated with heavy ions*. Dissertation, TU Darmstadt
- Leer, J. W., van, H. P., & Davelaar, J. 1998, "Indications and treatment schedules for irradiation of benign diseases: a survey", *Radiother.Oncol.*, vol. 48, no. 3, pp. 249-257.
- Lewis, C. & Murdoch, C. 2005, "Macrophage responses to hypoxia: implications for tumor progression and anti-cancer therapies", *Am.J Pathol.*, vol. 167, no. 3, pp. 627-635.
- Lewis, C. E. & Pollard, J. W. 2006, "Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments", *Cancer Res.*, vol. 66, no. 2, pp. 605-612.
- Lewis, C. E. & Hughes, R. 2007, "Inflammation and breast cancer. Microenvironmental factors regulating macrophage function in breast tumours: hypoxia and angiopoietin-2", *Breast Cancer Res.*, vol. 9, no. 3, p. 209.
- Lin, P. S., Ho, K. C., Sung, S. J., & Tsai, S. 1993, "Cytotoxicity and manganese superoxide dismutase induction by tumor necrosis factor- α and ionizing radiation in MCF-7 human breast carcinoma cells", *Lymphokine Cytokine Res.*, vol. 12, no. 5, pp. 303-308.
- Lindl, T. & Bauer, J. 1987, *Zell- und Gewebekultur* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Littlefield, L. G., Colyer, S. P., Joiner, E. E., & DuFrain, R. J. 1979, "Sister chromatid exchanges in human lymphocytes exposed to ionizing radiation during G₀", *Radiat.Res.*, vol. 78, no. 3, pp. 514-521.
- Liu, W., Ding, I., Chen, K., Olschowka, J., Xu, J., Hu, D., Morrow, G. R., & Okunieff, P. 2006, "Interleukin 1 β (IL1 β) signaling is a critical component of radiation-induced skin fibrosis", *Radiat.Res.*, vol. 165, no. 2, pp. 181-191.

Kapitel 6: Literaturliste

- Löbrich, M., Rydberg, B., & Cooper, P. K. 1994, "DNA double-strand breaks induced by high-energy neon and iron ions in human fibroblasts. II. Probing individual notI fragments by hybridization", *Radiat.Res.*, vol. 139, no. 2, pp. 142-151.
- Lorimore, S. A., Coates, P. J., Scobie, G. E., Milne, G., & Wright, E. G. 2001, "Inflammatory-type responses after exposure to ionizing radiation in vivo: a mechanism for radiation-induced bystander effects?", *Oncogene*, vol. 20, no. 48, pp. 7085-7095.
- Louagie, H., Van, E. M., Philippe, J., Thierens, H., & De, R. L. 1999, "Changes in peripheral blood lymphocyte subsets in patients undergoing radiotherapy", *Int.J Radiat.Biol.*, vol. 75, no. 6, pp. 767-771.
- Mabuchi, K., Soda, M., Ron, E., Tokunaga, M., Ochikubo, S., Sugimoto, S., Ikeda, T., Terasaki, M., Preston, D. L., & Thompson, D. E. 1994, "Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part I: Use of the tumor registries in Hiroshima and Nagasaki for incidence studies", *Radiat.Res.*, vol. 137, no. 2 Suppl, pp. S1-16.
- Madsen M & Johnsem H.E 1979, "A methodological study of E-rosette formation using AET-treated sheep erythrocytes.", *J Immunol.Methods*, vol. 27, pp. 61-74.
- Mahe, M. A., Andre, M. J., Moyon, E., Le, M. A., Soubeyran, P., Hamidou, M., Milpied, N., Bourdin, S., Cuilliere, J. C., & Chatal, J. F. 1997, "Chromosome aberrations after radiotherapy in patients treated for non Hodgkin's lymphoma", *Ann.Genet.*, vol. 40, no. 2, pp. 92-98.
- Manti, L., Durante, M., Grossi, G., Ortenzia, O., Pugliese, M., Scampoli, P., & Gialanella, G. 2006, "Measurements of metaphase and interphase chromosome aberrations transmitted through early cell replication rounds in human lymphocytes exposed to low-LET protons and high-LET 12C ions", *Mutat.Res.*, vol. 596, no. 1-2, pp. 151-165.
- Mantini, G., Manfrida, S., Cellini, F., Giammarino, D., Petrone, A., Vitucci, P., & Cellini, N. 2005, "Impact of dose and volume on radiation-induced mucositis", *Rays*, vol. 30, no. 2, pp. 137-144.
- McKinney, L. C., Aquilla, E. M., Coffin, D., Wink, D. A., & Vodovotz, Y. 2000, "Ionizing radiation potentiates the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma and/or lipopolysaccharide in murine macrophage cell lines. Role of tumor necrosis factor-alpha", *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, vol. 899, pp. 61-68.
- Miller, K. 1991, "Clastogenic effects of bleomycin, cyclophosphamide, and ethyl methanesulfonate on resting and proliferating human B- and T-lymphocytes", *Mutat.Res.*, vol. 251, no. 2, pp. 241-251.
- Mishell, B. B. & Shiigi, S. M. 1980, *Selected methods in cellular immunology* W.H. Freeman and Company, SF, USA.
- Mohan, N. & Meltz, M. L. 1994, "Induction of nuclear factor kappa B after low-dose ionizing radiation involves a reactive oxygen intermediate signaling pathway", *Radiat.Res.*, vol. 140, no. 1, pp. 97-104.
- Morgan, W. F. & Crossen, P. E. 1980, "X irradiation and sister chromatid exchange in cultured human lymphocytes", *Environ.Mutagen.*, vol. 2, no. 2, pp. 149-155.
- Mücke, R., Schonekaes, K., Micke, O., Seegenschmiedt, M. H., Berning, D., & Heyder, R. 2003, "Low-dose radiotherapy for painful heel spur. Retrospective study of 117 patients", *Strahlenther.Onkol.*, vol. 179, no. 11, pp. 774-778.

Kapitel 6: Literaturliste

- Müller, K. & Meineke, V. 2007, "Radiation-induced alterations in cytokine production by skin cells", *Exp.Hematol.*, vol. 35, no. 4 Suppl 1, pp. 96-104.
- Munro, T. R. 1970a, "The site of the target region for radiation-induced mitotic delay in cultured mammalian cells", *Radiat.Res.*, vol. 44, no. 3, pp. 747-757.
- Munro, T. R. 1970b, "The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts", *Radiat.Res.*, vol. 42, no. 3, pp. 451-470.
- Murdoch, C., Giannoudis, A., & Lewis, C. E. 2004, "Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues", *Blood*, vol. 104, no. 8, pp. 2224-2234.
- Murdoch, C., Muthana, M., & Lewis, C. E. 2005, "Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation", *J Immunol.*, vol. 175, no. 10, pp. 6257-6263.
- Murdoch, C. & Lewis, C. E. 2005, "Macrophage migration and gene expression in response to tumor hypoxia", *Int.J Cancer*, vol. 117, no. 5, pp. 701-708.
- Nagler, A. & Greenberg, P. L. 1990, "Bone marrow cell modulation and inhibition of myelopoiesis by large granular lymphocytes and natural killer cells", *Int.J.Cell Cloning*, vol. 8, no. 3, pp. 171-183.
- Nasonova, E., Ritter, S., Fomenkova, T., & Kraft, G. 1998, "Induction of chromosomal damage in CHO-K1 cells and their repair-deficient mutant XRS5 by X-ray and particle irradiation", *Adv.Space Res.*, vol. 22, no. 4, pp. 569-578.
- Nasonova, E., Ritter, S., Gudowska-Nowak, E., & Kraft, G. 2001, "High-LET-induced chromosomal damage: time-dependent expression", *Phys.Med.*, vol. 17 Suppl 1, pp. 198-201.
- Nasonova, E. & Ritter, S. 2004, "Cytogenetic effects of densely ionising radiation in human lymphocytes: impact of cell cycle delays", *Cytogenet.Genome Res.*, vol. 104, no. 1-4, pp. 216-220.
- Nasonova, E., Fussel, K., Berger, S., Gudowska-Nowak, E., & Ritter, S. 2004, "Cell cycle arrest and aberration yield in normal human fibroblasts. I. Effects of X-rays and 195 MeV u(-1) C ions", *Int.J.Radiat.Biol.*, vol. 80, no. 9, pp. 621-634.
- Natarajan, M., Aravindan, N., Meltz, M. L., & Herman, T. S. 2002, "Post-translational modification of I-kappa B alpha activates NF-kappa B in human monocytes exposed to 56Fe ions", *Radiat.Environ.Biophys.*, vol. 41, no. 2, pp. 139-144.
- Nathan, C. F. & Hibbs, J. B., Jr. 1991, "Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity", *Curr.Opin.Immunol.*, vol. 3, no. 1, pp. 65-70.
- Ohlweiler S. 2005, *Einfluss von Phosphodiesterase 4 und Proteinphosphatase 1 auf die Regulation proinflammatorischer Cytokine und Stickstoffmonoxid in Lipopolysaccharid-aktivierten Makrophagen*. Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
- Ohta, S., Matsuda, S., Gunji, M., & Kamogawa, A. 2007, "The role of nitric oxide in radiation damage", *Biol.Pharm.Bull.*, vol. 30, no. 6, pp. 1102-1107.
- Okunieff, P., Xu, J., Hu, D., Liu, W., Zhang, L., Morrow, G., Pentland, A., Ryan, J. L., & Ding, I. 2006, "Curcumin protects against radiation-induced acute and chronic cutaneous toxicity in mice and decreases mRNA expression of inflammatory and fibrogenic cytokines", *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, vol. 65, no. 3, pp. 890-898.

Kapitel 6: Literaturliste

- Old L.J 1988, "Der Tumor Nekrose Faktor", *Spektrum der Wissenschaft*, vol. 7, pp. 42-51.
- Pajonk, F., Pajonk, K., & McBride, W. H. 1999, "Inhibition of NF-kappaB, clonogenicity, and radiosensitivity of human cancer cells", *J Natl.Cancer Inst.*, vol. 91, no. 22, pp. 1956-1960.
- Parry, G. C. & Mackman, N. 1997, "Role of cyclic AMP response element-binding protein in cyclic AMP inhibition of NF-kappaB-mediated transcription", *J Immunol.*, vol. 159, no. 11, pp. 5450-5456.
- Perry, P. & Wolff, S. 1974, "New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids", *Nature*, vol. 251, no. 5471, pp. 156-158.
- Philippe, J., Louagie, H., Thierens, H., Vral, A., Cornelissen, M., & De, R. L. 1997, "Quantification of apoptosis in lymphocyte subsets and effect of apoptosis on apparent expression of membrane antigens", *Cytometry*, vol. 29, no. 3, pp. 242-249.
- Piotrowski, T., Matecka-Nowak, M., & Milecki, P. 2005, "Prediction of radiation pneumonitis: dose-volume histogram analysis in 62 patients with non-small cell lung cancer after three-dimensional conformal radiotherapy", *Neoplasma*, vol. 52, no. 1, pp. 56-62.
- Pollock, J. S., Forstermann, U., Mitchell, J. A., Warner, T. D., Schmidt, H. H., Nakane, M., & Murad, F. 1991, "Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells", *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A*, vol. 88, no. 23, pp. 10480-10484.
- Pons, I., Gras, G., Courberand, S., Benveniste, O., & Dormont, D. 1997, "Consequences of gamma-irradiation on inflammatory cytokine regulation in human monocytes/macrophages", *Int.J.Radiat.Biol.*, vol. 71, no. 2, pp. 157-166.
- Preston, D. L., Kusumi, S., Tomonaga, M., Izumi, S., Ron, E., Kuramoto, A., Kamada, N., Dohy, H., Matsuo, T., Matsui, T., & . 1994, "Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987", *Radiat.Res.*, vol. 137, no. 2 Suppl, p. S68-S97.
- Preston, D. L., Ron, E., Yonehara, S., Kobuke, T., Fujii, H., Kishikawa, M., Tokunaga, M., Tokuoka, S., & Mabuchi, K. 2002, "Tumors of the nervous system and pituitary gland associated with atomic bomb radiation exposure", *J.Natl.Cancer Inst.*, vol. 94, no. 20, pp. 1555-1563.
- Preston, D. L., Shimizu, Y., Pierce, D. A., Suyama, A., & Mabuchi, K. 2003, "Studies of mortality of atomic bomb survivors. Report 13: Solid cancer and noncancer disease mortality: 1950-1997", *Radiat.Res.* , vol. 160, no. 4, pp. 381-407.
- Preston, D. L., Pierce, D. A., Shimizu, Y., Ron, E., & Mabuchi, K. 2003, "Dose response and temporal patterns of radiation-associated solid cancer risks", *Health Phys.*, vol. 85, no. 1, pp. 43-46.
- Pui, C. H., Relling, M. V., & Downing, J. R. 2004, "Acute lymphoblastic leukemia", *N.Engl.J Med.*, vol. 350, no. 15, pp. 1535-1548.
- Raschke, W. C., Baird, S., Ralph, P., & Nakoinz, I. 1978, "Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus", *Cell*, vol. 15, no. 1, pp. 261-267.
- Rietschel, E. T., Brade, L., Schade, F. U., Seydel, U., Zahringer, U., Mamat, U., Schmidt, G., Ulmer, A. J., Loppnow, H., Flad, H. D., & . 1993, "[Bacterial endotoxins: relationship between chemical structure and biological effect]", *Immun.Infekt.*, vol. 21, no. 2, pp. 26-35.

Kapitel 6: Literaturliste

- Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, F. U., Ulmer, A. J., Holst, O., Brade, H., Schmidt, G., Mamat, U., Grimmecke, H. D., Kusumoto, S., & . 1993, "The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity", *Immunobiology*, vol. 187, no. 3-5, pp. 169-190.
- Ritter, S., Nasonova, E., Scholz, M., Kraft-Weyrather, W., & Kraft, G. 1996, "Comparison of chromosomal damage induced by X-rays and Ar ions with an LET of 1840 keV/micrometer in G1 V79 cells", *Int.J.Radiat.Biol.*, vol. 69, no. 2, pp. 155-166.
- Ritter, S., Nasonova, E., Furusawa, Y., & Ando, K. 2002, "Relationship between aberration yield and mitotic delay in human lymphocytes exposed to 200 MeV/u Fe-ions or X-rays", *J.Radiat.Res.(Tokyo)*, vol. 43 Suppl, p. S175-S179.
- Ritter, S., Nasonova, E., Gudowska-Nowak, E., Scholz, M., & Kraft, G. 2002, "Integrated chromosome aberration yields determined for V79 cells after high LET radiation", *Int.J.Radiat.Biol.*, vol. 78, no. 11, pp. 1063-1064.
- Ritter, S., Nasonova, E., & Gudowska-Novak, E. 2002, "Effect of LET on the yield and quality of chromosomal damage in metaphase cells: a time-course study", *Int.J.Radiat.Biol.*, vol. 78, no. 3, pp. 191-202.
- Rodel, F., Kamprad, F., Sauer, R., & Hildebrandt, G. 2002, "[Functional and molecular aspects of anti-inflammatory effects of low-dose radiotherapy]", *Strahlenther.Onkol.*, vol. 178, no. 1, pp. 1-9.
- Rodel, F., Keilholz, L., Herrmann, M., Sauer, R., & Hildebrandt, G. 2007, "Radiobiological mechanisms in inflammatory diseases of low-dose radiation therapy", *Int.J.Radiat.Biol.*, vol. 83, no. 6, pp. 357-366.
- Ron, E., Preston, D. L., Mabuchi, K., Thompson, D. E., & Soda, M. 1994, "Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part IV: Comparison of cancer incidence and mortality", *Radiat.Res.*, vol. 137, no. 2 Suppl, pp. S98-112.
- Rübe, C. E., Wilfert, F., Uthe, D., Schmid, K. W., Knoop, R., Willich, N., Schuck, A., & Rübe, C. 2002, "Modulation of radiation-induced tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) expression in the lung tissue by pentoxifylline", *Radiother.Oncol.*, vol. 64, no. 2, pp. 177-187.
- Rübe, C. E., Rodemann, H. P., & Rube, C. 2004a, "[The relevance of cytokines in the radiation-induced lung reaction. Experimental basis and clinical significance]", *Strahlenther Onkol*, vol. 180, no. 9, pp. 541-549.
- Rübe, C. E., Wilfert, F., Palm, J., König, J., Burdak-Rothkamm, S., Liu, L., Schuck, A., Willich, N., & Rübe, C. 2004b, "Irradiation induces a biphasic expression of pro-inflammatory cytokines in the lung", *Strahlenther Onkol*, vol. 180, no. 7, pp. 442-448.
- Rübe, C. E., Uthe, D., Wilfert, F., Ludwig, D., Yang, K., König, J., Palm, J., Schuck, A., Willich, N., Remberger, K., & Rübe, C. 2005, "The bronchiolar epithelium as a prominent source of pro-inflammatory cytokines after lung irradiation", *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, vol. 61, no. 5, pp. 1482-1492.
- Rubin, P., Finkelstein, J., & Shapiro, D. 1992, "Molecular biology mechanisms in the radiation induction of pulmonary injury syndromes: interrelationship between the alveolar macrophage and the septal fibroblast", *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, vol. 24, no. 1, pp. 93-101.
- Ryan, K. A., Smith, M. F., Jr., Sanders, M. K., & Ernst, P. B. 2004, "Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression", *Infect.Immun.*, vol. 72, no. 4, pp. 2123-2130.

Kapitel 6: Literaturliste

- Rydberg, B., Lobrich, M., & Cooper, P. K. 1994, "DNA double-strand breaks induced by high-energy neon and iron ions in human fibroblasts. I. Pulsed-field gel electrophoresis method", *Radiat.Res.*, vol. 139, no. 2, pp. 133-141.
- Rydberg, B., Cooper, B., Cooper, P. K., Holley, W. R., & Chatterjee, A. 2005, "Dose-dependent misrejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in human fibroblasts: experimental and theoretical study for high- and low-LET radiation", *Radiat.Res.*, vol. 163, no. 5, pp. 526-534.
- Savage, J. R. 1976, "Classification and relationships of induced chromosomal structural changes", *J.Med.Genet.*, vol. 13, no. 2, pp. 103-122.
- Schaue, D., Marples, B., & Trott, K. R. 2002, "The effects of low-dose X-irradiation on the oxidative burst in stimulated macrophages", *Int.J.Radiat.Biol.*, vol. 78, no. 7, pp. 567-576.
- Schaue, D., Jahns, J., Hildebrandt, G., & Trott, K. R. 2005, "Radiation treatment of acute inflammation in mice", *Int.J.Radiat.Biol.*, vol. 81, no. 9, pp. 657-667.
- Schilling, D. 2000, *Untersuchung zur differenziellen Regulation der Produktion pro-inflammatorischer Cytokine und Charakterisierung der negativen Regulation von Interleukin-1 β in Lipopolysaccharid-aktivierten Makrophagen*, Shaker Verlag.
- Schilling, D., Beissert, T., Fenton, M.J. & Nixdorff, K.. 2001. "Negative regulation of IL-1 β production at the level of transcription in macrophages stimulated with LPS", *Cytokine*, vol. 16, pp. 51-61.
- Schmid, E. & Roos, H. 1996, "Dose dependent of sister chromatid exchanges in humans lymphocytes induced by in vitro alpha-particle irradiation", *Radiat.Enviro.Biophys.*, vol. 35, no. 4, pp. 311-314.
- Schmidt, R. E. 1987, "Anti T11 monoclonal antibodies activate human natural killer (NK) cells via the T11/E rosette receptor", *Beitr.Infusionther.Klin.Ernahr.*, vol. 18, pp. 266-271.
- Schmidt, R. E., Michon, J. M., Woronicz, J., Schlossman, S. F., Reinherz, E. L., & Ritz, J. 1987, "Enhancement of natural killer function through activation of the T11 E rosette receptor", *J.Clin.Invest*, vol. 79, no. 1, pp. 305-308.
- Schmitz, A., Bayer, J., Dechamps, N., & Thomas, G. 2003, "Intrinsic susceptibility to radiation-induced apoptosis of human lymphocyte subpopulations", *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys*, vol. 57, no. 3, pp. 769-778.
- Schmitz, A., Bayer, J., Dechamps, N., Goldin, L., & Thomas, G. 2007, "Heritability of susceptibility to ionizing radiation-induced apoptosis of human lymphocyte subpopulations", *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys*, vol. 68, no. 4, pp. 1169-1177.
- Scholz, M. 2003, "Effects of ion radiation on cells and tissues", *Adv Polym Sci*, vol. 162.
- Schulz-Ertner, D., Nikoghosyan, A., Diding, B., & Debus, J. 2004, "Carbon ion radiation therapy for chordomas and low grade chondrosarcomas--current status of the clinical trials at GSI", *Radiother.Oncol.*, vol. 73 Suppl 2, p. S53-S56.
- Schulz-Ertner, D., Jakel, O., & Schlegel, W. 2006, "Radiation therapy with charged particles", *Semin.Radiat.Oncol.*, vol. 16, no. 4, pp. 249-259.
- Schulz-Ertner, D., Karger, C. P., Feuerhake, A., Nikoghosyan, A., Combs, S. E., Jakel, O., Edler, L., Scholz, M., & Debus, J. 2007, "Effectiveness of carbon ion radiotherapy in the treatment of skull-base chordomas", *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, vol. 68, no. 2, pp. 449-457.

Kapitel 6: Literaturliste

- Schulz-Ertner, D., Nikoghosyan, A., Hof, H., Diding, B., Combs, S. E., Jakel, O., Karger, C. P., Edler, L., & Debus, J. 2007, "Carbon ion radiotherapy of skull base chondrosarcomas", *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, vol. 67, no. 1, pp. 171-177.
- Schwartz, J. L. & Gaulden, M. E. 1980, "The relative contributions of B and T lymphocytes in the human peripheral blood mutagen test system as determined by cell survival, mitogenic stimulation, and induction of chromosome aberrations by radiation", *Environ.Mutagen.*, vol. 2, no. 4, pp. 473-485.
- Schwartz, J. L., Darr, J. C., & Gaulden, M. E. 1983, "Survival and PHA-stimulation of gamma-irradiated human peripheral blood T lymphocyte subpopulations", *Mutat.Res.*, vol. 107, no. 2, pp. 413-425.
- Seegenschmiedt, M. H., Katalinic, A., Makoski, H., Haase, W., Gademann, G., & Hassenstein, E. 2000, "Radiation therapy for benign diseases: patterns of care study in Germany", *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, vol. 47, no. 1, pp. 195-202.
- Sharma, V., Hupp, C. D., & Tepe, J. J. 2007, "Enhancement of chemotherapeutic efficacy by small molecule inhibition of NF-kappaB and checkpoint kinases", *Curr.Med.Chem.*, vol. 14, no. 10, pp. 1061-1074.
- Sherman, M. L., Datta, R., Hallahan, D. E., Weichselbaum, R. R., & Kufe, D. W. 1991, "Regulation of tumor necrosis factor gene expression by ionizing radiation in human myeloid leukemia cells and peripheral blood monocytes", *J Clin.Invest.*, vol. 87, no. 5, pp. 1794-1797.
- Shilnikova, N. S., Preston, D. L., Ron, E., Gilbert, E. S., Vassilenko, E. K., Romanov, S. A., Kuznetsova, I. S., Sokolnikov, M. E., Okatenko, P. V., Kreslov, V. V., & Koshurnikova, N. A. 2003, "Cancer mortality risk among workers at the Mayak nuclear complex", *Radiat.Res.*, vol. 159, no. 6, pp. 787-798.
- Shimizu, Y., Mabuchi, K., Preston, D. L., & Shigematsu, I. 1996, "Mortality study of atomic-bomb survivors: implications for assessment of radiation accidents", *World Health Stat.Q.*, vol. 49, no. 1, pp. 35-39.
- Shimizu, Y., Pierce, D. A., Preston, D. L., & Mabuchi, K. 1999, "Studies of the mortality of atomic bomb survivors. Report 12, part II. Noncancer mortality: 1950-1990", *Radiat.Res.*, vol. 152, no. 4, pp. 374-389.
- Shintani, T., Hayakawa, N., Hoshi, M., Sumida, M., Kurisu, K., Oki, S., Kodama, Y., Kajikawa, H., Inai, K., & Kamada, N. 1999, "High incidence of meningioma among Hiroshima atomic bomb survivors", *J.Radiat.Res.(Tokyo)*, vol. 40, no. 1, pp. 49-57.
- Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A., & Allavena, P. 2006, "Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy", *Eur.J Cancer*, vol. 42, no. 6, pp. 717-727.
- Sica, A., Rubino, L., Mancino, A., Larghi, P., Porta, C., Rimoldi, M., Solinas, G., Locati, M., Allavena, P., & Mantovani, A. 2007, "Targeting tumour-associated macrophages", *Expert.Opin.Ther.Targets.*, vol. 11, no. 9, pp. 1219-1229.
- Sica, A. & Bronte, V. 2007, "Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development", *J Clin.Invest.*, vol. 117, no. 5, pp. 1155-1166.
- Steinman, L. 2007, "A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage", *Nat.Med.*, vol. 13, no. 2, pp. 139-145.

Kapitel 6: Literaturliste

- Tarr, J. M., Eggleton, P., & Winyard, P. G. 2006, "Nitric oxide and the regulation of apoptosis in tumour cells", *Curr.Pharm.Des*, vol. 12, no. 34, pp. 4445-4468.
- Tasat, D. R., Mancuso, R., Molinari, B. L., Saint-Martin, G., Perez de la, H. A., Bernaola, O. A., Kreiner, A. J., Schuff, J. A., Palmieri, M., Mazal, A., Stoliar, P., Burlon, A., Davidson, M., Davidson, J., Debray, M. E., Kesque, J. M., Somacal, H., Naab, G., Ozafran, M. J., & Vazquez, M. E. 2003, "Low energy proton irradiation effects on alveolar macrophages from young and aged rats", *Cell Mol.Biol.(Noisy-le-grand)*, vol. 49 Online Pub, p. OL387-OL392.
- Tasat, D. R., Mancuso, R., O'Connor, S., & Molinari, B. 2003, "Age-dependent change in reactive oxygen species and nitric oxide generation by rat alveolar macrophages", *Aging Cell*, vol. 2, no. 3, pp. 159-164.
- Trott, K. R. 1994, "Therapeutic effects of low radiation doses", *Strahlenther.Onkol.*, vol. 170, no. 1, pp. 1-12.
- van Zutven, L. J., van, D. E., de Bont, J. M., Wattel, M. M., Den Boer, M. L., Pieters, R., Hagemeijer, A., Slater, R. M., & Beverloo, H. B. 2005, "CDKN2 deletions have no prognostic value in childhood precursor-B acute lymphoblastic leukaemia", *Leukemia*, vol. 19, no. 7, pp. 1281-1284.
- Vral, A., Louagie, H., Thierens, H., Philippe, J., Cornelissen, M., & De, R. L. 1998, "Micronucleus frequencies in cytokinesis-blocked human B lymphocytes after low dose gamma-irradiation", *Int.J Radiat.Biol.*, vol. 73, no. 5, pp. 549-555.
- Vral, A., Cornelissen, M., Thierens, H., Louagie, H., Philippe, J., Strijckmans, K., & De, R. L. 1998, "Apoptosis induced by fast neutrons versus 60Co gamma-rays in human peripheral blood lymphocytes", *Int.J Radiat.Biol.*, vol. 73, no. 3, pp. 289-295.
- Vral, A., Thierens, H., Bryant, P., & De, R. L. 2001, "A higher micronucleus yield in B-versus T-cells after low-dose gamma-irradiation is not linked with defective Ku86 protein", *Int.J Radiat.Biol.*, vol. 77, no. 3, pp. 329-339.
- Ward, J. F. 1994, "DNA damage as the cause of ionizing radiation-induced gene activation", *Radiat.Res.*, vol. 138, no. 1 Suppl, p. S85-S88.
- Wardman, P. 2007, "Chemical radiosensitizers for use in radiotherapy", *Clin.Oncol.(R.Coll.Radiol.)*, vol. 19, no. 6, pp. 397-417.
- Wardman, P., Rothkamm, K., Folkers, L. K., Woodcock, M., & Johnston, P. J. 2007, "Radiosensitization by nitric oxide at low radiation doses", *Radiat.Res.*, vol. 167, no. 4, pp. 475-484.
- Webb, S. D., Owen, M. R., Byrne, H. M., Murdoch, C., & Lewis, C. E. 2007, "Macrophage-based anti-cancer therapy: modelling different modes of tumour targeting", *Bull.Math.Biol.*, vol. 69, no. 5, pp. 1747-1776.
- Weber, U. 1996, *Volumenkonforme Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen zur Vorbereitung einer Strahlentherapie*, Gesamthochschule Kassel, Dissertation, 1996.
- Westphal O, Lüderitz O, & Bister F. Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. 7b, 147-155. Z.Naturforsch.
Ref Type: Generic

Kapitel 6: Literaturliste

- Wewers, M. D. & Herzyk, D. J. 1989, "Alveolar macrophages differ from blood monocytes in human IL-1 beta release. Quantitation by enzyme-linked immunoassay", *J.Immunol.*, vol. 143, no. 5, pp. 1635-1641.
- Wilson, R. E., Taylor, S. L., Atherton, G. T., Johnston, D., Waters, C. M., & Norton, J. D. 1993, "Early response gene signalling cascades activated by ionising radiation in primary human B cells", *Oncogene*, vol. 8, no. 12, pp. 3229-3237.
- Winter, M. 2002, *Einfluss von Strahlung auf die Zellzyklus-Progression und die Ausprägung von Chromosomenschäden*.
- Winter, M. 2007, *Zelluläre und molekularbiologische Grundlagen der vorzeitigen Alterung humaner Fibroblasten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen und Kohlenstoffionen*.
- Wong, G. H. 1995, "Protective roles of cytokines against radiation: induction of mitochondrial MnSOD", *Biochim.Biophys.Acta*, vol. 1271, no. 1, pp. 205-209.
- Wood, J. & Garthwaite, J. 1994, "Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties", *Neuropharmacology*, vol. 33, no. 11, pp. 1235-1244.
- Wuttke, K., Streffer, C., & Muller, W. U. 1993, "Radiation induced micronuclei in subpopulations of human lymphocytes", *Mutat.Res.*, vol. 286, no. 2, pp. 181-188.

7. Anhang

7.1 Wertetabellen / Tabellenverzeichnis

Wertetabelle zu Abbildung 4.1.1

Kernfläche [μm^2]	Anzahl Kerne
10	21
20	122
30	300
40	920
50	1445
60	958
70	287
80	89
90	5760
100	3157
110	131
120	1

Wertetabelle zu Abbildung 4.1.2

Kernfläche [μm^2]	Anzahl Kerne
10	4
15	294
20	1410
25	1400
30	637
35	185
40	63
45	26
50	5
55	0
60	0

Wertetabelle zu Abbildung 4.1.3

[h]	K	\pm	2 Gy	\pm	2 Gy LPS - 1h	\pm	2 Gy LPS + 2 h		K + LPS	\pm
0	6	0,48	7	0,56	5,25		0,36	/	3,8	0,19
12	11	0,88	6,3	0,5	7,2		0,5	/	8,4	0,42
24	24	1,92	12,6	1	15,3		1	/	16	0,8
48	42	3,36	24,5	1,96	36		2,52	/	45	2,25
72	56	4,48	26	2,08	42		2,94	/	43	2,15

Wertetabelle zu Abbildung 4.1.4 (A)

[h]	PBMC PWA	\pm	B- und T-Lymphozyten PWA	\pm	B-Lymphozyten PWA
0	3,53	0,1	3,65	0,18	3,2
24	4,33	0,13	4,15	0,2	2,89
48	4,43	0,13	4,52	0,22	2,63
72	4,98	0,15	5	0,25	2,21
96	6,06	0,18	5,9	0,29	2,01

Wertetabelle zu Abbildung 4.1.4 (B)

[h]	PBMC PHA	±	B- und T-Lymphozyten PHA		B.Lymphozyten PHA	±
0	2,61	0,08	2,48	0,15	2,36	0,04
24	2,82	0,08	2,64	0,16	2,21	0,04
48	3,56	0,1	3,46	0,20	2,03	0,04
72	4,89	0,15	4,63	0,27	1,84	0,03
96	7,26	0,22	6,84	0,41	1,52	0,03

Wertetabelle zu Abbildung 4.2.1

[Gy]	24 h +LPS	±	24 h -LPS	±
0	1	0,04	1	0,01
0,25	0,99	0,01	0,94	0,01
0,5	0,93	0,03	0,91	0,01
0,75	0,89	0,03	0,87	0,03
1	0,98	0,05	0,89	0,04
2	0,89	0,02	0,89	0,02
4	0,98	0,05	0,89	0,02
8	0,83	0,02	0,82	0,01
16	0,90	0,02	0,84	0,01
32	0,89	0,03	0,83	0,04

Wertetabelle zu Abbildung 4.2.2

[Gy]	48 h +LPS	±	48 h -LPS	±
0	1	0,01	0,97	0,02
0,25	0,97	0,02	0,93	0,03
0,5	0,93	0,03	0,91	0,03
0,75	0,91	0,03	0,9	0,01
1	0,90	0,01	0,84	0,02
2	0,84	0,03	0,85	0,02
4	0,85	0,03	0,79	0,02
8	0,8	0,02	0,8	0,01
16	0,8	0,01	0,78	0,02
32	0,78	0,02	0,74	0,03

Wertetabelle zu Abbildung 4.2.3

[Gy]	24 h +LPS	±	24 h -LPS	±
0	0,99	0,06	0,97	0,03
0,25	1	0,01	0,89	0,02
0,5	0,97	0,02	0,86	0,03
0,75	0,92	0,03	0,86	0,03
1	0,94	0,05	0,89	0,06
2	0,94	0,02	0,8	0,02
4	0,94	0,02	0,85	0,05
8	0,87	0,02	0,75	0,03
16	0,89	0,01	0,79	0,01
32	0,87	0,05	0,76	0,01

Wertetabelle zu Abbildung 4.2.4

[Gy]	48 h +LPS	±	48 h -LPS	±
0	1	0,02	0,92	0,07
0,25	0,76	0,04	1	0,01
0,5	0,78	0,04	0,84	0,02
0,75	0,71	0,02	0,84	0,04
1	0,73	0,03	0,79	0,01
2	0,77	0,03	0,62	0,01
4	0,56	0,03	0,61	0,01
8	0,52	0,05	0,61	0,01
16	0,57	0,01	0,56	0,03
32	0,52	0,01	0,61	0,02

Wertetabelle zu Abbildung 4.2.5

[Gy]	24 h +LPS	±	24 h -LPS	±
0		--	1	0,02
0,5	0,97	0,01	0,96	0,03
1	0,96	0,04	0,97	0,01
2	0,93	0,03	0,93	0,04
4	0,91	0,02	0,92	0,06
6	0,87	0,01	0,86	0,02
8	0,84	0,02	0,88	0,03
10	0,83	0,01	0,83	0,03
12	0,85	0,01	0,85	0,02
14	0,8	0,03	0,80	0,03
16	0,798	0,02	0,81	0,0

Wertetabelle zu Abbildung 4.2.6

[Gy]	48 h +LPS	±	48 h -LPS	±
0			1	0,01
0,5	0,98	0,02	0,97	0,03
1	0,97	0,02	0,93	0,04
2	0,92	0,03	0,91	0,03
4	0,9	0,01	0,9	0,02
6	0,84	0,03	0,84	0,02
8	0,83	0,03	0,84	0,02
10	0,78	0,01	0,79	0,03
12	0,79	0,01	0,8	0,02
14	0,76	0,02	0,78	0,01
16	0,74	0,03	0,74	0,03

Wertetabelle zu Abbildung 4.2.7

[Gy]	24 h +LPS	±	24 h -LPS	±
0	1	0,012	0,99	0,02
0,5	0,98	0,02	1	0,03
1	0,96	0,03	0,96	0,04
2	0,93	0,01	0,95	0,01
4	0,91	0,06	0,89	0,05
6	0,98	0,03	0,88	0,02
8	0,86	0,04	0,85	0,03
10	0,83	0,07	0,83	0,04
12	0,82	0,02	0,81	0,05
14	0,8	0,09	0,79	0,02
16	0,79	0,03	0,78	0,05

Wertetabelle zu Abbildung 4.2.8

[Gy]	24 h	±
0	1	0,03
0,5	0,93	0,04
1	0,98	0,078
2	0,88	0,02
4	0,81	0,05
8	0,78	0,04
12	0,66	0,08
16	0,53	0,02

Wertetabelle zu Abbildung 4.2.9

[Gy]	24 h	±	48 h	±
0	1	0,01	1	0,01
0,5	0,93	0,01	0,94	0,05
1	0,9	0,01	0,82	0,01
2	0,96	0,136	0,67	0,08
4	0,74	0,01	0,42	0,02
6	0,77	0,01	0,41	0,05
8	0,75	0,03	0,4	0,023
10	0,65	0,01	0,34	0,02
12	0,68	0,03	0,31	0,01
14	0,63	0,01	0,27	0,03
16	0,64	0,01	0,31	0,01

Wertetabelle zu Abbildung 4.3.1 (A)

[Gy]	TNF 24 h +LPS	±	TNF 24 h -LPS
0	30176	1627	573
0,5	29276	596	365
1	29896	317	375
2	25673	4098	285
4	27502	1487	421
6	22784	2704	296
8	25603	519	441
10	25340	348	354
12	23286	511	213
14	25115	635	237
16	23559	1836	1272

Wertetabelle zu Abbildung 4.3.1 (B)

[Gy]	TNF 24 h +LPS	±	TNF 24 h -LPS
0	9341	73	0
0,25	9003	223	0
0,5	9379	402	0
0,75	8851	306	0
1	9560	241	0
2	9911	46	0
4	8416	420	0
8	8014	148	0
16	7646	196	0
32	7227	209	0

Wertetabelle zu Abbildung 4.3.2 (A)

[Gy]	TNF 24 h +LPS	±	TNF 24 h -LPS
0	7389	709	0
0,25	6721	53	0
0,5	6719	91	0
0,75	6640	140	0
1	6619	70	0
2	6045	491	0
4	6509	44	0
8	6235	143	0
16	6085	100	0
32	5931	67	0

Wertetabelle zu Abbildung 4.3.2 (B)

[Gy]	TNF 24 h +LPS	±	TNF 24 h -LPS
0	9733	167	0
0,25	9562	148	0
0,5	9624	125	0
0,75	8857	247	0
1	9371	234	0
2	9923	77	0
4	10630	159	0
8	10067	630	0
16	9789	364	0
32	9264	397	0

Wertetabelle zu Abbildung 4.3.3

[Gy]	TNF 48 h +LPS	±	TNF 48 h -LPS	±
0	1005	49	24	100
0,25	760	37	0	0
0,5	695	28	0	0
0,75	614	50	1	25
1	405	9	9	16
2	452	23	2	3
4	374	27	0	0
8	345	16	0	0
16	371	27	4	0
32	305	18	26	0

Wertetabelle zu Abbildung 4.3.4

[Gy]	TNF 24 h +LPS	±	TNF 24 h -LPS
0	4623	37	0
0,25	4480	114	0
0,5	4663	224	0
0,75	4501	149	0
1	4800	112	0
2	4199	263	0
4	4359	110	0
8	4007	74	0
16	3463	68	0
32	3466	279	0

Wertetabelle zu Abbildung 4.3.5 (A)

[Gy]	TNF 24 h +LPS	±	TNF 24 h -LPS
0	1099	35	0
0,25	1045	19	0
0,5	1048	27	0
0,75	1088	82	0
1	1101	3	0
2	1009	12	0
4	1030	1	0
8	971	50	0
16	1291	47	0
32	1244	4	0

Wertetabelle zu Abbildung 4.3.5 (B)

[Gy]	TNF 24 h +LPS	±	TNF 24 h -LPS
0	265	11	0
0,25	188	30	0
0,5	268	39	0
0,75	312	7	0
1	379	1	0
2	309	2	0
4	467	45	0
8	429	17	0
16	497	11	0
32	514	87	0

Wertetabelle zu Abbildung 4.4.1

[Gy]	IL-1 β 24 h +LPS	±	IL-1 β 24 h -LPS
0	477	2	0
0,25	462	4	0
0,5	399	2	0
0,75	414	8	0
1	437	14	0
2	494	4	0
4	542	23	0
8	568	15	0
16	665	38	0
32	710	8	0

Wertetabelle zu Abbildung 4.4.2

[Gy]	IL-1 β 24 h +LPS	\pm	IL-1 β 24 h -LPS
0	900	31	0
0,25	949	14	0
0,5	1044	17	0
0,75	924	52	0
1	931	35	0
2	916	26	0
4	888	137	0
8	664	108	0
16	571	97	0
32	447	114	0

Wertetabelle zu Abbildung 4.4.3

[Gy]	IL-1 β 24 h +LPS(A)	\pm	IL-1 β 24 h +LPS(B)	\pm	IL1 β 24 h -LPS
0	276	25	162	22	12
0,25	369	27	214	35	13
0,5	440	46	227	29	23
0,75	384	28	179	24	14
1	466	66	225	14	33
2	356	13	246	5	6
4	463	19	253	19	9
8	343	37	255	10	18
16	403	30	286	25	15
32	564	27	273	19	13

Wertetabelle zu Abbildung 4.5.1 (A)

[Gy]	NO 24 h +LPS	\pm	NO 24 h -LPS
0	45	2	0
0,25	30	2	0
0,5	21	1	0
0,75	15	1	0
1	24	2	0
2	27	3	0
4	39	1	0
8	34	1	0
16	47	5	0
32	39	1	0

Wertetabelle zu Abbildung 4.5.1 (B)

[Gy]	NO 24 h +LPS	\pm	NO 24 h -LPS
0	43	0,43	0
0,25	43,7	0,29	0
0,5	44	0,6	0
0,75	42	0,38	0
1	33	2,9	0
2	45	0,34	0
4	46	0,34	0
8	45,4	0,3	0
16	48	0,3	0
32	47,4	0,4	0

Wertetabelle zu Abbildung 4.5.2 (A)

[Gy]	NO 24 h +LPS	±	NO 24 h -LPS
0	8,8	0,1	0
0,25	9,3	0,1	0
0,5	9,6	0,1	0
0,75	17,7	0,6	0
1	20,4	0,	0
2	40,5	0,3	0
4	53,5	0,4	0
8	120,8	2,9	0
16	123,8	1,1	0
32	130,9	4,1	0

Wertetabelle zu Abbildung 4.5.2 (B)

[Gy]	NO 24 h +LPS		NO 24 h -LPS
0	26,2	0,5	0
0,25	30,1	0,7	0
0,5	33,1	0,7	0
0,75	35,1	0,6	0
1	38,6	1,1	0
2	44,1	2,1	0
4	54,8	1,4	0
8	63,1	1,2	0
16	88,1	1,7	0
32	137,3	4,5	0

Wertetabelle zu Abbildung 4.6.1

[Gy]	Beads/Zelle 24h +LPS		Beads/Zelle 24 h -LPS	
0	6,6	0,4	2,7	0,17
0,25	6,4	0,5	2,3	0,19
0,5	6,2	0,47	2,4	0,2
0,75	6,1	0,45	2,6	0,2
1	5	0,37	2,9	0,36
2	6,7	0,5	3	0,28
4	6,7	0,38	3,6	0,35
8	8,4	0,6	3,6	0,28
16	8,2	0,5	5,3	0,35
32	7,6	0,8	6,1	0,46

Kapitel 7: Anhang

Wertetabelle zu Abbildung 4.6.2

[Gy]	Beads/Zelle 24 h +LPS		Beads/Zelle 24 h -LPS	
0	7,1	0,28	7,4	0,30
0,25	8,7	0,27	7,1	0,34
0,5	8,8	0,35	8,1	0,3
0,75	9	0,32	7,9	0,45
1	9,8	0,37	10,1	0,26
2	13	0,41	10,5	0,59
4	12,2	0,45	15,2	0,63
8	19	0,9	23,5	0,82
16	16,5	0,49	11,3	0,96
32	20,7	0,69	14,1	1,34

Wertetabelle zu Abbildung 4.6.3

[Gy]	Beads/Zelle 24 h +LPS		Beads/Zelle 24 h -LPS	
0	6,1	0,3	4,3	0,1
0,25	6,8	0,1	5	0,1
0,5	8,1	0,15	6,1	0,1
0,75	9	0,2	6,4	0,2
1	8,9	0,3	7	0,1
2	10,3	0,3	8,5	0,2
4	12	0,2	10,2	0,3
8	14	0,5	11,6	0,46
16	13,1	0,2	10,5	0,4
32	14,7	0,4	12,5	0,4

Tabelle 4.7.2

Donor	Dosis	MI	Stimuliert	1M	2M	3M	Zellzahl	Aberr. Zell	Aberr/100 Zellen
		%	%B -%R light -%R cond.	%	%	%		%	
408	2Gy 96h	0,6	8 - 7.4 - 84.6	64	27	9	100	65	154
540	2Gy 96h	1,1	nd	nd	nd	nd	142	58	89
028	2Gy 72h	0,48	3.5 - 16 - 80.5	50	35	15	21	57	110
									117,6666667
670	1Gy 96h	2,7	29.5 - 12 - 58.5	87	12	1	100	39	52
348	1Gy 96h	3,2	31 - 7.3 - 61.7	n.d.			100	35	58
									55,00
408	4Gy 96h	0,5	7.9 - 8.8 - 83.3	62	28	10	96	95	281
028	Ko. 72h	0,81	11.4 - 13.8 - 74.8	35	43	22	50	2	2
408	Ko. 96h	1,9	10 - 17.5 - 72.5	58	26	16	200	5,5	5,5
278	Ko. 96h	1,2	6.7 - 6.6 - 86.7	34	23	43	100	6	6
670	Ko. 96h	7,5	24.4 - 11.1 - 64.5	81	16	3	100	6	6
830	Ko. 96h	0,4	5.1 - 20.3 - 74.6						
848	Ko. 96h	0,55	7.2 - 31.6 - 61.2						

Kapitel 7: Anhang

Donor	Dosis	Aberration	Typen						SCE/chs	4n Zellen	4n Zelle
		ctb	csb	dmin	dic	r	cte	Summe		1M	2M
408	2Gy 96h	5	48	12	79	8	2	154	0,19	3	0
540	2Gy 96h	6	38	6	37	2	0	89	nd	nd	nd
028	2Gy 72h	0	48	19	43	0	0	110			
670	1Gy 96h	2	16	5	27	2	0	52	nd	nd	nd
348	1Gy 96h	5	21	3	22	6	1	58	nd		
408	4Gy 96h	10	91	15	153	7	5	281	0,15	22	17
28	Ko. 72h	2	0	0	0	0	0		nd		
408	Ko. 96h	4	1	0	0,5	0	0		0,17		0
278	Ko. 96h	3	3	0	0	0	0		0,17		
670	Ko. 96h	5	1	0	0	0	0		nd		
830	Ko. 96h										

MI= Mitoseindex (siehe Kapitel 3.11.1); 1M,2M,3M= Mitosen in der 1., 2., 3. Metaphase nach Bestrahlung

Wertetabelle zu Abbildung 4.7.2

	Anzahl Aberrationen		
	1 Gy	2 Gy	4 Gy
B-Lymphozyten	58	89	281
	52	154	
		110	
T-Lymphozyten	38	114	319
	27	110,6	323
	42	110	366
	34	118	427
	37	107	300
		105	
		115,7	
		128	
		138	
		125	
		151	
		84	
		95	
		97	
		111	
		106	
		101	

Tabelle 4.7.3

Donor	Dosis	MI	Stimuliert	1M	2M	3M	Zellzahl	Aberr. Zell	Aberr/100 Zellen
		%	%B -%R light -%R cond	%	%	%		%	
408	1Gy 96h	1,8	9.9 - 13.6 - 76.5	52	40	8	100	83	203
278	1Gy 96h	2,3	17.4 - 9.8 - 72.8	38	62	0	100	61	106
028	1Gy 72h	0,86	10.5 - 26.7 - 26.8	46	37	17	100	57	104
848	1 Gy 96h	0,9	7.2 - 17.6 - 75.2	22	54	24			137,67
408	2Gy 96h	0,9	10.3 - 14.8 - 74.9	53	30	17	86	90	270
278	2Gy 96h	0,8	9.9 - 8.1 - 82	50	43	7	55	93	255
830	2Gy 72h	0,2	2.6 - 15.5 - 81.9	71	21	8	50	94	246
830	2Gy 96h	0,55	2.2 - 27.8 70						
848	2Gy 96h	0,4	5.4 - 22.6 - 72	31	43	26	23	91	313
028	2Gy 72h	0,17	2.5 - 24 - 73.5	76	17	7	60	93	220

Donor	Dosis	Aberr. Typen							SCE/chrs	4n Zelle	4n Zelle
		ctb	csb	dmin	dic	r	cte	Summe		1.M	2.M
408	1Gy 96h	11	64	16	105	3	4	203	0,2	3	2
278	1Gy 96h	8	43	8	42	4	1	106	0,14	4,2	
028	1Gy 72h	4	28	23	45	3	2	105	0,17	nd	nd
848	1 Gy 96h										
408	2Gy 96h	6	105	19	126	7	8	271	0,2	nd	nd
278	2Gy 96h	4	102	24	102	20	4	256	nd	12	0
830	2Gy 72h	18	92	14	106	12	4	246	0,2	12	2
830	2Gy 96h										
848	2Gy 96h	9	104	26	152	18	4	313	nd	nd	nd
028	2Gy 72h	2	60	38	108	12	0	220	nd	nd	nd

Wertetabelle zu Abbildung 4.7.3

	Anzahl Aberrationen	
	1 Gy	2 Gy
B-Lymphozyten	203	270
	105	255
	104	246
	137,67	313
	/	220
T-Lymphozyten	96	152
	125	226
	108	204
	/	225

Wertetabelle zu Abbildung 4.7.4

[Gy]	B-Zellen C		B-Zellen X		T-Zellen C		T-Zellen X	
0	6	0	5	0	5	0	2	0
1	138	56,6	55	4,2	110	14,6	37	6,1
2	261	34,4	118	33,5	217	45,8	112	16,1
4	/	/	281	0	510	119	348	45,5

X= Röntgenbestrahlung; C= Kohlenstoffionenbestrahlung

Wertetabelle zu Abbildung 4.7.5

	SCE / Chromosom			
	0 Gy	1 Gy	2 Gy	4 Gy
B-Zellen C-ionen	0,17	0,2	0,2	/
		0,14	0,2	
		0,17		
B-Zellen X-ray	0,17	/	0,19	0,15
T-Zellen C-Ionen	0,2	0,22	0,26	0,24
		0,22	0,26	
		0,26	0,23	
		0,3	0,21	
		0,22	0,24	
			0,24	
T-Zellen X-ray	0,2	0,27	0,26	0,26
		0,26	0,26	0,24
			0,23	
			0,21	
			0,24	
			0,24	

Wertetabelle zu Abbildung 4.7.6

	Stimulierte Zellen [%]		
	0 Gy	1 Gy	2 Gy
B-Zellen C-Ionen 96h	4,9	17,2	9,9
	6,9	9,9	10,3
	10	7,2	5,4
	6,7	/	2,2
	24,1	/	&
B-Zellen C-Ionen 72h	11,4	10,5	2,5
			2,6
B-Zellen X-rays 96h	/	31	8
	/	29,5	/
B-Zellen X-rays 72h	/	/	3,5
T-Zellen C-Ionen 96h	7,1	11,6	4,8
	14	26,1	8,6
	22,5	/	/

Wertetabelle zu Abbildung 4.7.7

	Metaphasen in der 1. Mitose nach Bestrahlung [%]			
	0 Gy	1 Gy	2 Gy	4 Gy
B-Zellen C-Ionen 96h	34	52	53	/
	81	38	50	/
	/	22	31	/
B-Zellen C-Ionen 72h	35	46	71	/
	/	/	76	/
B-Zellen X-rays 96h	58	87	64	62
B-Zellen X-rays 72h	/	/	50	/

Wertetabelle zu Abbildung 4.7.8

CD19	0Gy	2X	4X	1C	2C
0h	9	9	9	9	9
48h	11	30	15	16	20
96h	22	30	20	25	25

CD3	0Gy	2X	4X	1C	2C
0h	71	71	71	71	71
48h	60	57	65	58	60
96h	65	50	60	60	55

CD14	0Gy	2X	4X	1C	2C
0h	9	9	9	9	9
48h	/	5	8	5	9
96h	5	3	/	5	9

CD56	0Gy	2X	4X	1C	2C
0h	1	1	1	1	1
48h	2	2	4	3	7
96h	6	4	6	5	6

2X bzw. 4X = 2Gy bzw. 4Gy Röntgenstrahlung

1C bzw. 2C = 1Gy bzw. 2Gy Kohlenstoffionenbestrahlung

Wertetabelle zu Abbildung 4.7.9

	408 B-Zellen	408 T-Zellen	278 B-Zellen	278 T-Zellen
0	8,6	6,2	9,1	7,7
C1	44,2	25	35,2	26,6
C2	50	30	43,9	42,9
X2	28			
X4	41,3			

Wertetabelle zu Abbildung 4.7.10

	Anteil an B-Zellen [%]
K 0h	9,3
K 48h	6,3
C1 48h	7
C2 48h	6,5
X2 48h	8,2
K 72h	11,3
C1 72h	7,7
C2 72h	6,3
X2 72h	7,9

Wertetabelle zu Abbildung 4.7.11

	Anteil an B-Zell-Mitosen [%]
K 48h	8,3
C1 48h	7,1
C2 48h	1,5
X2 48h	2,9
K 72h	25,2
C1 72h	19,4
C2 72h	11,8
X2 72h	11,3

Wertetabelle zu Abbildung 4.7.12

	Verhältnis B-Zell-Apoptosen zum B-Zell-Anteil
48h	1,07
72h	2,5
96h	1,6

7.2 Chemikalienliste

5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU)	Roche Diagnostics, Mannheim
Ammoniumsulfat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin)	Roche Diagnostics, Mannheim
Colcemid 10 µg/ml in H ₂ O	Roche Diagnostics, Mannheim
DAPI (4',6Diamidino-2-phenylindol,duhydrochlorid)	Roche Diagnostics, Mannheim
Deconex 11 universal	Borer Chemie, Zuchwil, Schweiz
Dinatriumhydrogenphosphat Dodecahydrat	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	PAN Systems, Aidenbach
Eukitt	O.Kindler, Freiburg
Formaldehyd	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibca GmbH, Eggenstein
Giemsa (Azur-Eosin-Methylenblaulösung)	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	PAN Systems, Aidenbach
Glycerin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Griess-Reagenz	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Kapitel 7: Anhang

Helipur H plus N	Serva, Heidelberg
Hoechst 33258	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Isoton (Casyton)	Schärfe, Reutlingen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Latex-Beads	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogensulfat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
PBS, Pulver ohne Calcium und Magnesium	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
PBS, sterile Lösung ohne Calcium und Magnesium	PAN Systems, Aidenbach
Penicillin 10 000 U	PAN Systems, Aidenbach
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Streptomycin 10 000 U	PAN Systems, Aidenbach
tri-Natriumcitrat-dihydrat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Tween-20	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Wasser Ultrareines Wasser aus Milli-Q Plus Filteranlage	Millipore, Eschborn
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

7.3 Einweg- und Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	IDL, Nidderau
Pipetten	Greiner, Frickenhausen
Mikrotiterplatten	Nunv GmbH, Wiesbaden
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter	Schleicher+Schull, Einbeck
Zellkulturflaschen	BD Bioscience, NJ, USA
Zellkulturschalen	Omega Scientific, CA, USA
Zellzahlgefäße	Schärfe Systems, Reutlingen

7.4 Geräte, Apparaturen und Software

Autoklaven	H+P Labortechnik, München
Durchflußzytometer	Pertec, Münster
Inkubatoren	Thermo Electro, Langenscheid Nuaire, Plymouth, MN, USA
Kamera	Nikon Instruments, Melville, USA
Mikroskope	Leica, Bensheim Olympus, Hamburg
pH-Meter	Knick, Berlin
Röntgenröhre	Seifert, Bridge Port, USA
Schüttler	Edmund Bühler, Tübingen IKA, Staufen
Sterilisator	Thermo Electron, Langenselbold
Tiefkühlschrank -80°C	Thermo Electron, Langenselbold
Trockenschrank	Thermo Electron, Langenselbold
UV-Lampen	Novodirekt, Karlsruhe

	Illkirch, Frankreich
Wasseraufbereitungssystem	Millipore, Eschbach
Wasserbäder	Julabo, Seelbach
Zellzählung	Schärfe, Reutlingen
Zentrifugen	Thermo Electron, Langenselbold Fischer Scientific, Schwerte
Bildanalyse	Image J, NIH, MY, USA
Zellkernflächenbestimmung	Image J, NIH, MY, USA LabView 6.1, G. Böhrson, GSI, Darmstadt
Bildaufnahmesystem	LabView 6.1, G. Böhrson, GSI, Darmstadt

7.5 Verwendete Antikörper

Anti CD3-FITC T-Zell-Marker	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland Klon BW264/56
Anti CD14-PE Monozyten-Marker	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland Klon TÜK4
Anti CD19-PE B-Zell-Marker	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland Klon LT19
Anti CD38-FITC Plasmazell-Marker	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland Klon IB6
Anti-CD45-FITC Leukozyten-Marker	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland Klon 5B1
Maus IgG1 Isotypkontrolle-FITC	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland Klon IS5-21F5
Mause IgG2a Isotypkontrolle-FITC	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland Klon S43.10

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Sandro Conrad

Justus von Liebig Str. 34

63128 Dietzenbach

Geboren am 06 Juni 1977

Schulbildung:

1983-1991: Grundschule Dietrich- Bonhöfer,
Dietzenbach

1991-1997: Gymnasium mit Abitur Heinrich
Mann Schule, Dietzenbach

Juni 1997 Abitur

Hochschulstudium:

Oktober 1997- April 2003: Biologie an
der TU Darmstadt. Schwerpunktfächer
Mikrobiologie, Genetik Biochemie

Abschluss: Diplom Biologe

Promotion:

Dezember 2003- Dezember 2007 in der
Arbeitsgruppe Nixdorff; TU Darmstadt
in Kooperation mit der Gesellschaft für
Schwerionenforschung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende
Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln
angefertigt habe.

Darmstadt, 12 November 2007